

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktion: Univ.Prof. Dr. med. Marianne Dieterich, FANA

**Die Rolle von High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) in der
Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christopher Höhne
aus
Bamberg

2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Edgar Meinl Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Kastenbauer Prof. Dr. med. Peter Bartenstein
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	apl. Prof. Dr. med. Uwe Ködel
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	30.07.2015

Eidesstattliche Versicherung

Höhne, Christopher Ludwig

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle von High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.11.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epidemiologie der Pneumokokkenmeningitis	1
1.2	Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis	3
1.3	Gegenwärtiges Konzept zur Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis	4
1.3.1	Übersicht über die Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis.....	4
1.3.2	Der Weg der Infektion.....	5
1.3.3	Konstitutive Infektabwehrschwäche im Subarachnoidalraum	7
1.3.4	Induktion der Immunreaktion im Liquorraum	7
1.3.5	Verstärkung der Immunantwort durch körpereigene Immunmediatoren.....	11
1.3.6	Zentrale Mechanismen der Hirnschädigung.....	11
1.3.6.1	Hirnödem und Steigerung des intrakraniellen Drucks	12
1.3.6.2	Gefäßkomplikationen	13
1.3.7	Endogene Alarmsignale	13
1.3.7.1	HMGB1 – ein endogenes Alarmsignal	14
1.3.7.2	Rezeptoren von HMGB1	17
2	FRAGESTELLUNGEN.....	20
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	In-vitro Versuche.....	21
3.1.1	Kulturbedingungen.....	21
3.1.2	Zelllinien und primäre Zellen.....	21
3.1.2.1	J774.2-Makrophagen.....	21
3.1.2.2	Hoxb8-Granulozyten	22
3.1.2.3	Knochenmarks-Makrophagen	22
3.1.2.4	Knochenmarks-Neutrophile	24
3.1.3	Zellkulturexperimente	24
3.1.3.1	J774.2-Makrophagen.....	24
3.1.3.2	Hoxb8-Granulozyten	25
3.1.3.3	Knochenmarks-Makrophagen	26
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl	26

3.1.5	Messung der LDH-Aktivität.....	27
3.1.6	Chemotaxie-Untersuchungen in vitro	27
3.2	Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis.....	28
3.2.1	Tierversuchsgenehmigung.....	30
3.2.2	Versuchstiere	31
3.2.3	Klinische Untersuchung und klinischer Score	31
3.2.4	Infektion	32
3.2.5	Therapie.....	33
3.2.5.1	Antibiotische Therapie	33
3.2.5.2	Pharmakologische Eingriffe in den Wirkmechanismus von HMGB1	33
3.2.6	Behandlungen und Eingriffe am Versuchsende	34
3.2.7	Versuchsgruppen	35
3.2.7.1	Effekt von HMGB1-Antagonisten auf die Entwicklung einer Meningitis.....	35
3.2.7.2	Effekt von HMGB1-Antagonisten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium....	36
3.2.7.3	Einfluss von HMGB1 auf die Apoptose neutrophiler Granulozyten	37
3.2.7.4	Untersuchungen zur Rolle von RAGE	37
3.2.7.5	Chemotaktischer Effekt von HMGB1	38
3.2.8	Bestimmung der Leukozytenzahl im Liquor.....	38
3.2.9	Bestimmung der Bakterientiter im Maushirn-Homogenat und in Blutproben.....	39
3.2.10	Herstellung von Hirnschnitten und Quantifizierung von Blutungszahl und -fläche	39
3.2.11	Immunhistochemischer Nachweis von RAGE und HMGB1	41
3.2.12	Bestimmung der Zahl apoptotischer Zellen im Liquor.....	41
3.3	Messungen der Konzentrationen von IL-1β, TNF-α, TGF-β, CXCL1 und CXCL2 im Gehirn	42
3.4	Western Blot-Analysen von HMGB1	43
3.5	Statistische Methoden	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	HMGB1-Freisetzung in den Liquor während einer Pneumokokkenmeningitis	45

4.2	Effekt der HMGB1-Antagonisierung bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis	46
4.3	Wirkmechanismus von HMGB1	53
4.3.1	Einfluss von HMGB1 auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine	53
4.3.2	Einfluss von HMGB1 auf die Apoptose neutrophiler Granulozyten	53
4.3.3	Chemotaktischer Effekt von HMGB1	54
4.4	Bedeutung von RAGE als wichtiger Rezeptor für HMGB1 bei der Pneumokokkenmeningitis	57
4.5	Mechanismus der HMGB1-Freisetzung.....	60
5	DISKUSSION	64
5.1	HMGB1 als später Entzündungsmediator.....	64
5.2	Freisetzung von HMGB1	65
5.3	Funktion von HMGB1 in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis	67
5.4	Wirkungsweise von HMGB1	68
5.4.1	HMGB1 als Zytokin-ähnlicher Mediator	68
5.4.2	Effekte von HMGB1 auf Apoptose und Bakterienelimination	69
5.4.3	RAGE-vermittelte chemotaktische Effekte von HMGB1	71
5.4.4	Pathogenese-Modell der Pneumokokkenmeningitis unter Einbeziehung von HMGB1	72
6	ZUSAMMENFASSUNG	74
7	AUSBLICK.....	79
8	LITERATURVERZEICHNIS	80
9	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	98

10	ANHANG	99
10.1	Verwendete Chemikalien.....	99
10.2	Zellkulturmedien	101
10.3	Antikörper.....	102
10.4	Verbrauchsmaterialien	103
10.5	Labormaterial und Geräte	105
11	DANKSAGUNG	108
12	CURRICULUM VITAE	109

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD</i>
BMDM	Knochenmarks-Makrophagen (<i>bone marrow-derived macrophages</i>)
Cbp	Cholin-binde Proteine
CHO-Zellen	Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters (<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>)
CXCL1/2	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 1/2
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster (<i>damage-associated molecular patterns</i>)
DMEM	<i>Dublecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenylidonium
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS	Fetales bovines Serum
Hib	<i>Haemophilus influenzae Typ B</i>
HKP	Hitze-inaktivierte Pneumokokken
HMGB1	High mobility group box 1 protein
I	Stromstärke
ICP	Intrakranieller Druck (<i>intracranial pressure</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	Kolonien-bildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Letales Toxin
LTA	Lipoteichonsäure
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MnTBAP	Manganese(III)tetrakis (4-Benzosäure) Porphyrin

mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	Myeloid-Differenzierung-Faktor 88
NAC	N-acetyl-L-cystein
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuklearfaktor kappa B
NLR	Nod-Like-Rezeptoren (= <i>nucleotide-binding oligomerization domain-like-receptors</i>)
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
OD	Optische Dichte
ox-ATP	Oxidiertes Adenosin-Triphosphat
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pIgR	Polymere Immunglobulin-Rezeptoren
PLY	Pneumolysin
PRRs	Mustererkennungsrezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i>)
P/S	Penicillin/Streptomycin
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
REPS	Ringer-Ethylpyruvat-Lösung
rHMGB1	Rekombinantes HMGB1
RIP2	Rezeptor-interagierendes Protein 2
RLS	Ringerlaktat-Lösung
rM-CSF	rekombinanter Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCF	Stammzell-Faktor
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Std.	Stunden
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Spannung
u.a.	Unter anderem
UPM	Umdrehungen pro Minute

ZNS

Zentralnervensystem

z-YVAD-fmk

Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Pneumokokkenmeningitis

Die bakterielle Meningitis zählt mit einer weltweiten Inzidenz von 5-10/100.000 noch immer zu den häufigen Infektionserkrankungen. Nach einer Schätzung der WHO gehört die Meningitis mit 0.40 Millionen jährlichen Todesfällen zu den 10 häufigsten infektiösen Todesursachen weltweit (WHO, 2014).

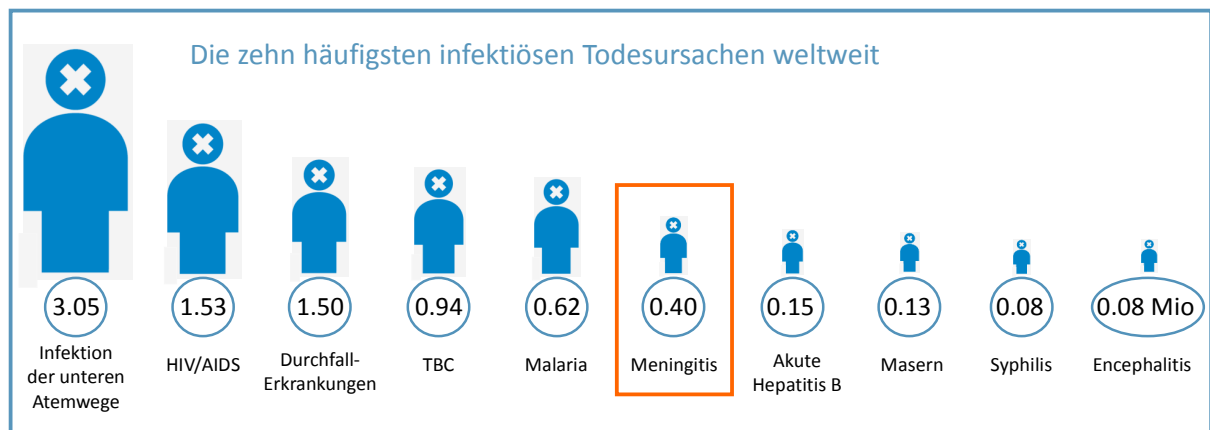


Abbildung 1: Die zehn häufigsten infektiösen Todesursachen weltweit im Jahr 2012 (WHO, 2014)

Zwischen 2003-2007 ereigneten sich in den USA jährlich schätzungsweise 4100 Erkrankungen an bakteriellen Meningitiden (Thigpen, M. C. et al., 2011). 1995 untersuchten Schuchat et al. 248 Fälle von bakterieller Meningitis in den USA: Dabei wurden 47 % der Meningitis-Fälle durch *Streptococcus pneumoniae*, 25 % der Fälle durch *Neisseria meningitidis*, 12 % durch Gruppe B Streptokokken, 8 % durch *Listeria monocytogenes* und 7 % durch *Haemophilus influenzae* ausgelöst (Schuchat, A. et al., 1997). Das Erregerspektrum ist dabei allerdings altersabhängig: In den westlichen Industriestaaten sind bei Neugeborenen und Säuglingen (< 1 Monat) *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* und *Streptococcus pneumoniae* die häufigsten Erreger einer bakteriellen Meningitis. Bei Säuglingen und Kleinkindern (1- 23 Monate) sind in erster Linie *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria meningitidis* bedeutend. Zwischen 2 und 18 Jahren führen *Neisseria meningitidis*, gefolgt von *Streptococcus pneumoniae*, die Liste der Erreger an. Im Erwachsenenalter werden über 50 % der bakteriellen Meningitiden durch *Streptococcus pneumoniae* und ungefähr ein Drittel durch *Neisseria meningitidis* verursacht

Einleitung

(Schuchat, A. et al., 1997; van de Beek, D. et al., 2004). Im höheren Alter von über 65 Jahren tritt *Listeria monocytogenes* als wichtigster Erreger an die zweite Stelle hinter *Streptococcus pneumoniae* (Hussein, A. S. und Shafran, S. D., 2000). Diese Daten beziehen sich jedoch ausschließlich auf die westlichen Industrienationen. Neben dem Alter unterliegt die Epidemiologie der bakteriellen Meningitis auch sozioökonomischen und geographischen Faktoren. In Nordamerika und Westeuropa konnte durch die Einführung der *Haemophilus influenzae* Typ B (Hib)-Impfung ein deutlicher Rückgang an Hib-Meningitiden beobachtet werden (Dawson, K. G. et al., 1999; Schuchat, A. et al., 1997). In diesen Regionen sind *S. pneumoniae* und *N. meningitidis* die am meisten verbreiteten Erreger der bakteriellen Meningitis (Dawson, K. G. et al., 1999; Koedel, U. et al., 2002a; Schuchat, A. et al., 1997). Für *S. pneumoniae* sind über 90 Serotypen bekannt, 23 sind für über 90 % der Pneumokokkenkrankungen verantwortlich. Diese Vielzahl und regionale Unterschiede in der Serotypenverteilung erschweren sowohl die Impfstoffentwicklung als auch die Effektivität vorhandener Impfstoffe (Koedel, U. et al., 2009b). Seit den 80er-Jahren existiert ein Polysaccharid-Impfstoff, der gegen 23 Serotypen gerichtet ist. Allerdings hinterlässt die Applikation eines Polysaccharid-Impfstoffes keine bleibende und langfristige Immunität, da dabei die Induktion von Antikörpern T-Zell-unabhängig erfolgt und keine B-Gedächtniszellen produziert werden (Koedel, U. et al., 2009b). Bei Kleinkindern unter 2 Jahren wird zudem aufgrund des noch unreifen Immunsystems keine ausreichende Immunantwort erreicht (Cowan, M. J. et al., 1978). Ein im Jahr 2000 in den USA zugelassener heptavalenter Konjugat-Impfstoff deckte etwa 70 % der dort zirkulierenden Serotypen ab. Durch den Einsatz dieses Impfstoffes konnte die Inzidenz der Meningitis bei unter 2-jährigen deutlich um 64 %, in der Altersgruppe der 18-39-Jährigen um 28 % und bei über 65-Jährigen um 54% reduziert werden. Allerdings kam es zu einem Anstieg von Erkrankungsfällen, die von Serotypen ausgelöst wurden, die nicht vom Impfstoff erfasst worden waren (Hsu, H. E. et al., 2009; Koedel, U. et al., 2009b). In Deutschland wird vom Robert Koch-Institut eine generelle Impfung gegen Pneumokokken für alle Kinder unter 2 Jahren empfohlen. Für Personen über 60 Jahre wird als Standardimpfung eine einmalige Impfung mit einem Pneumokokken-Polysaccharid-Impfstoff empfohlen. Darüber hinaus existieren Impfempfehlungen für Risikogruppen, insbesondere für Immunsupprimierte und Personen mit chronischen Erkrankungen (RKI, 2013).

Vor Einführung der antibiotischen Therapie endeten Pneumokokkenmeningitiden fast ausnahmslos letal. Seit der Einführung der Antibiotikatherapie sanken die Letalitätsraten der Pneumokokkenmeningitis auf 25-35 % (Swartz, M. N., 2004; Tyler, K. L., 2008). Damit stellt die Pneumokokkenmeningitis die gefährlichste Form der bakteriellen Meningitis dar (Koedel, U. et al., 2009b; van de Beek, D. et al., 2004). Seit Anfang des 21. Jahrhunderts wird die adjuvante Gabe von Dexamethason empfohlen, worunter die Letalitätszahlen der Pneumokokkenmeningitis signifikant reduziert werden konnten (Brouwer, M. C. et al., 2013; de Gans, J. und van de Beek, D., 2002). Die adjuvante Dexamethason-Gabe bei Erwachsenen mit einer Pneumokokkenmeningitis hat daher auch Einzug in die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie gefunden. Die Reduktion der Letalität durch den Einsatz von Dexamethason beweist zudem den Effekt einer immunmodulierenden Therapie. Dennoch ist die Letalität der Pneumokokkenmeningitis mit 14 % weiterhin inakzeptabel hoch, zudem muss die Dexamethason-Gabe vor bzw. zeitgleich mit der antibiotischen Therapie erfolgen, eine Nachbehandlung ist nicht möglich (de Gans, J. und van de Beek, D., 2002). Damit wird deutlich, dass dringend zusätzliche Behandlungsformen entwickelt werden müssen.

Ein weiteres Problem neben der hohen Letalität stellen die Folgeschäden einer überstandenen Meningitis dar. Neuropsychologische Langzeitfolgen, Hörschäden und fokale neurologische Defizite betreffen 30-50 % der Überlebenden (Jit, M., 2010; Ramakrishnan, M. et al., 2009; Schmidt, H. et al., 2006). Neuropathologisches Korrelat dieser Residuen stellen Gewebeuntergänge in verschiedenen Hirnregionen dar. Diese Gewebeschäden werden insbesondere durch die massive neutrophile Entzündungsreaktion verursacht (Koedel, U. et al., 2010a; b; Weber, J. R. und Tuomanen, E. I., 2007).

1.2 Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis

Häufig treten in der Akutphase der Erkrankung bei Patienten sowohl extrakranielle als auch intrakranielle Komplikationen unterschiedlichen Schweregrades auf. In einer Studie zur Pneumokokkenmeningitis analysierten Kastenbauer und Pfister 87 Fälle, die zwischen Januar 1984 und April 2002 behandelt worden waren. Insgesamt erlitten 74.7 % der Patienten intrakranielle und 37.9 % systemische Komplikationen. Nur 48.3 % konnten in gutem Gesundheitszustand entlassen werden, 24.1 % der Patienten verstarben (Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003). Van de Beek et al. untersuchten insgesamt 696 Fälle von ambulant erworbener bakterieller Meningitis bei Erwachsenen (Patienten älter als 16 Jahre) zwischen Oktober 1998 und April 2002 in den Niederlanden. 352 dieser Fälle wurden durch *S.*

pneumoniae ausgelöst. Bei 65% der Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis traten fokale neurologische Defizite auf, bei 24 % epileptische Anfälle, bei 38 % kardiorespiratorisches Versagen; 30 % der Patienten verstarben (van de Beek, D. et al., 2004). Gefährliche intrakranielle Komplikationen stellen das Hirnödem (30 %), zerebrovaskuläre Komplikationen (ca. 15-30 %), Hydrozephalus (10-15 %), vestibulocochleäre Beteiligung (10-30 %), Hirnnervenparesen (10 %) und Zerebritiden (weniger als 5 %) dar. Zu den häufigsten systemischen Komplikationen zählen der septische Schock, Verbrauchskoagulopathien, dialysepflichtige Nierenfunktionsstörungen und ARDS (*adult respiratory distress syndrome*) (Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003; Koedel, U. et al., 2009b; Pfister, H. W. et al., 1993; Weisfelt, M. et al., 2006).

1.3 Gegenwärtiges Konzept zur Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis

1.3.1 Übersicht über die Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis

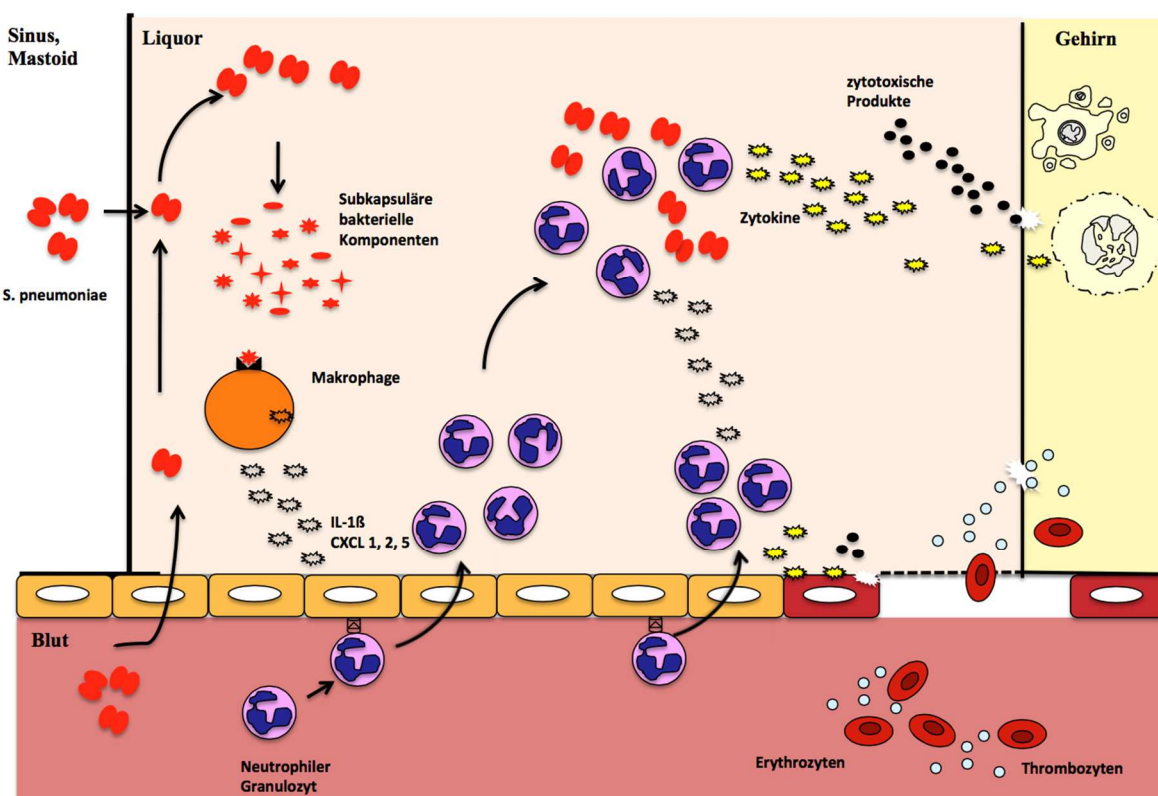


Abbildung 2: Übersicht über die Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis (modifiziert nach Koedel, U. et al., 2010b), Erklärungen siehe Text

Einleitung

Eine Pneumokokkenmeningitis entwickelt sich, wenn *S. pneumoniae* in den Subarachnoidalraum (Liquorraum) gelangt. Dies kann hämatogen oder kontinuierlich auf direktem Weg, von einer in der Nähe gelegenen Infektion (z.B. Sinusitis, Mastoiditis) ausgehend, erfolgen. Mangels immunkompetenter Zellen und Opsoninen, wie Komplement und IgG, im Liquorraum können sich die Bakterien dort exponentiell vermehren, bis es aufgrund von schlechten Wachstumsbedingungen infolge von Nährstoffmangel zur Selbstaflösung der Bakterien kommt. Dabei werden subkapsuläre Zellwandbestandteile freigesetzt. Diese sogenannten PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) werden von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*) detektiert und führen über verschiedene Signalkaskaden zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (wie IL-1 β , CXCL1, 2 und 5). Infolgedessen werden neutrophile Granulozyten in den Liquorraum rekrutiert. Die eingewanderten Neutrophilen sind nicht in der Lage, die Pneumokokken zu eliminieren, stattdessen setzen sie zytotoxische Substanzen frei, die das umgebende Hirngewebe schädigen können. Gefäßschädigungen durch zytotoxische Substanzen können zur Entwicklung eines vasogenen Hirnödems und zur Entstehung von Blutgerinnseln führen, was eine zerebrale Hypoperfusion zur Folge haben kann. Zudem können aber auch Produkte der Pneumokokken selbst, wie z.B. Pneumolysin, direkt zytotoxisch wirken und vaskulären und neuronalen Schaden anrichten.

1.3.2 Der Weg der Infektion

Der Nasopharynx ist das Hauptreservoir für *Streptococcus pneumoniae*. Die höchsten Trägerraten finden sich unter jungen Kindern, wobei Menschenansammlungen, wie sie z.B. in Kindertagesstätten, Pflegeheimen (Nuorti, J. P. et al., 1998), Krankenhäusern oder Gefängnissen vorkommen, zu weitaus höheren Besiedlungen führen (Bogaert, D. et al., 2001). So wurden in einer Studie in einem Zeitraum von 1995 bis 1996 in 59 kanadischen Kindertagesstätten 1322 Kinder untersucht, bei 44.3 % davon konnte *S. pneumoniae* im nasopharyngealen Abstrich nachgewiesen werden (Kellner, J. D. und Ford-Jones, E. L., 1999).

Eine Pneumokokkenmeningitis entwickelt sich typischerweise durch Infektion des Subarachnoidalraumes. Bei Kindern ist diese Infektion meist vom Nasopharynx ausgehend hämatogen bedingt. Voraussetzung für die Kolonisation des Nasopharynx ist die Adhäsion an die Mukosa. Alle meningealen Pathogene scheinen Oberflächenproteine zu exprimieren, um mit den Wirtszellen zu interagieren; schätzungsweise produzieren Pneumokokken mehr als

500 solcher Oberflächenproteine (Koedel, U. et al., 2002a; Wizemann, T. M. et al., 2001). Eine Schlüsselrolle nimmt Phosphorylcholin ein. Spezielle Proteine, sogenannte Cholin-bindende Proteine (Cbp), können eine chemische Variante des Phosphorylcholins binden. Einen wichtigen Adhärenzfaktor stellt Cbp A, das häufigste dieser Proteine, dar (Koedel, U. et al., 2002a; Rosenow, C. et al., 1997). Zudem spielen die Neuraminidase A und die Immunglobulin (Ig)-A1-Protease eine wichtige Rolle bei der Kolonisation des Nasopharynx (Janoff, E. N. et al., 1999; Reinholdt, J. und Kilian, M., 1997; Tong, H. H. et al., 2000). Nach Adhärenz an die Mukosa können die Pneumokokken in die Blutbahn eindringen. Entscheidend dafür ist die Expression von polymeren Immunglobulin-Rezeptoren (pIgR) auf humanen Epithelzellen; durch ihre Bedeutung für den Transport von Antikörpern spielen diese eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Pneumokokken können diesen Transportmechanismus zweckentfremden, indem Cbp A an pIgR bindet; auf diese Weise können sie die Mukosa überwinden (Kaetzel, C. S., 2001; Zhang, J. R. et al., 2000). In der Blutbahn angekommen, müssen sich die Pneumokokken der Wirtsabwehr widersetzen. Dabei ist die Polysaccharid-Kapsel für das Überleben im Blut von herausragender Bedeutung. Diese wirkt wie ein Schutzschild und verhindert die Opsonierung der Erreger, wodurch sie von Zellen der unspezifischen Immunantwort, v.a. neutrophilen Granulozyten, nicht erkannt und nicht phagozytiert werden (Austrian, R., 1981; Koedel, U. et al., 2002a; Morona, J. K. et al., 2000; Musher, D. M., 1992). Die Blutbahn wird durch die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke vom ZNS getrennt. Die Blut-Hirn-Schranke wird von zerebromikrovaskulären Endothelzellen gebildet (Li, J. Y. et al., 2001; Risau, W. et al., 1998; Rubin, L. L. und Staddon, J. M., 1999). Diese verfügen über besondere Eigenschaften: (i) *Zonulae occludentes (tight junctions)* zur Reduktion der parazellulären Permeabilität, (ii) geringe pinozytotische Aktivität zur Reduktion des transzellulären Transports und (iii) spezifische Transportsysteme (Gloor, S. M. et al., 2001; Kniesel, U. und Wolburg, H., 2000; Koedel, U. et al., 2002a; Pardridge, W. M., 1999). Die Blut-Liquor-Schranke ist im Bereich der *Plexus choroidei* und in der Arachnoidea zwischen *Dura mater* und subarachnoidalem Liquor lokalisiert (Saunders, N. R. et al., 2000; Segal, M. B., 2000). Die *Plexus choroidei* stellen die entscheidende Grenzfläche zwischen Blut und Liquor dar, wobei Plexus-Ependymzellen die Barriere zwischen Blut und Liquor bilden (Del Bigio, M. R., 1995; Strazielle, N. und Ghersi-Egea, J. F., 2000). Untersuchungen am Tiermodell lassen davon ausgehen, dass Pneumokokken transzellulär durch das zerebrale Endothel und nicht durch das

Plexusependym in den Liquorraum eindringen (Rodriguez, A. F. et al., 1991; Zwijnenburg, P. J. et al., 2001).

Der vorherrschende Infektionsweg bei Erwachsenen findet auf kontinuierlichem Weg statt, ausgehend von fokalen und in unmittelbarer Nähe zum Subarachnoidalraum gelegenen Infektionen, wie z.B. bei Mastoiditis oder Sinusitis (Koedel, U. et al., 2010b). Ostergaard et al. untersuchten 187 Fälle mit Pneumokokkenmeningitis: Bei 30 % fand sich ein otogener Infektfokus, bei 8 % eine Sinusitis, 18 % hatten eine Pneumonie; bei 2 % waren alternative Infektfoci (z.B. septisches Arthritis, subphrenischer Abszess) nachweisbar, bei 42 % der Patienten konnte kein primärer Fokus detektiert werden (Ostergaard, C. et al., 2005).

1.3.3 Konstitutive Infektabwehrschwäche im Subarachnoidalraum

Sind die Bakterien einmal in den Subarachnoidalraum eingedrungen, können sie sich dort leicht vermehren, da im Liquorraum die Zahl immunkompetenter Zellen sehr gering ist. Zudem fehlen im Liquor lösliche Mustererkennungsrezeptoren (sogenannte PRRs), welche die Bakterien erkennen und deren Phagozytose auslösen könnten (Dujardin, B. C. et al., 1985; Stahel, P. F. et al., 1997). Außerdem mangelt es im Liquor an Opsoninen, wie Komplement und Immunglobulin G, um die eingedrungenen Bakterien zu markieren und dem Immunsystem zu präsentieren (Koedel, U. et al., 2002a; Simberkoff, M. S. et al., 1980; Smith, H. und Bannister, B., 1973). Überdies verhindert die Blut-Liquor-Schranke das Eintreten von Blutbestandteilen und löslichen Rezeptormolekülen in den Liquor (Pachter, J. S. et al., 2003). Weiterhin gibt es im Liquorraum anti-entzündliche Faktoren (z.B. transformierender Wachstumsfaktor beta; TGF- β), welche Immunreaktionen unterdrücken können (Niederkorn, J. Y., 2006). Aufgrund dieser Immunbedingungen können sich die eingedrungenen Pneumokokken im Subarachnoidalraum exponentiell vermehren und ähnlich hohe Titer wie unter Kulturbedingungen erreichen (Small, P. M. et al., 1986).

1.3.4 Induktion der Immunreaktion im Liquorraum

Das exponentielle Wachstum der Bakterien führt zum Mangel an Nährstoffen und zur Entwicklung eines sauren Milieus. Diese Veränderungen der Lebensbedingungen induzieren die Produktion autolytischer Zellwandenzyme, die zur Selbstaflösung der Bakterien und Freisetzung subkapsulärer Zellwandbestandteile wie Peptidoglykan, Lipoteichonsäure (LTA), Pneumolysin (PLY) und bakterieller DNA führen (Fischer, H. und Tomasz, A., 1984;

Kadioglu, A. et al., 2008; Koedel, U. et al., 2009b; Lewis, K., 2000; Moscoso, M. und Claverys, J. P., 2004). Diese Pathogen-assoziierten molekularen Muster, sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) werden von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) auf antigenpräsentierende Zellen (APCs) detektiert und sind entscheidend für die Immunaktivierung. Wichtige Mustererkennungsrezeptoren stellen Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie (TLR) (Beutler, B. A., 2009) und NOD-like Rezeptoren (NLRs, *nucleotide binding oligomerization domain-like receptors*) dar (Beutler, B. A., 2009; Chen, G. et al., 2009). Sie finden sich in niedrigen Konzentrationen in den Meningen, im Plexus choroideus, im Perivascularraum oder auf/in Astrozyten und Mikroglia im Hirnparenchym (Chinnery, H. R. et al., 2010; de Graaf, M. T. et al., 2011; Gehrman, J. et al., 1995; Mook-Kanamori, B. B. et al., 2011). Insbesondere die Toll-like Rezeptoren 2, 4 und 9, sowie Nod-like Rezeptoren gelten als entscheidende PRRs bei der Erkennung von Pneumokokken-Zellwandbausteinen (Koedel, U. et al., 2009b). Peptidoglykane und Lipoteichonsäure interagieren mit TLR2. Pneumolysin scheint TLR4 zu binden, TLR9 erkennt bakterielle DNA; Nod2 wird durch Peptidoglykane aktiviert (Girardin, S. E. et al., 2003; Malley, R. et al., 2003; Mogensen, T. H. et al., 2006; Mook-Kanamori, B. B. et al., 2011; Schroeder, N. W. et al., 2003; Yoshimura, A. et al., 1999). Vor einiger Zeit konnten NOD2 und dessen nachgeschaltetes Effektormolekül, die Rezeptor-interagierendes Protein 2 (RIP2)-Kinase, in murinen Gliazellen detektiert werden (Sterka, D., Jr. und Marriott, I., 2006; Sterka, D., Jr. et al., 2006). Liu et al. (2010) zeigten, dass NOD2 für eine inflammatorische Reaktion muriner Astrozyten und Mikroglia gegenüber *S. pneumoniae* notwendig ist. Opitz et al. (2004) untersuchten die Rolle von Nod-Proteinen bei der intrazellulären Erkennung von *S. pneumoniae*: Sie fanden u.a. heraus, dass Pneumokokken in menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) eindringen können und dort in Abhängigkeit von Nod2 einen proinflammatorischen Transkriptionsfaktor (Nuklearfaktor kappa B, siehe unten) aktivieren können. In früheren Untersuchungen konnte unsere Gruppe allerdings zeigen, dass der NOD2/RIP2-Signalweg keine zentrale Rolle in der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis einnimmt, eine RIP2-Defizienz hatte bei Mäusen keinen Einfluss auf das Leukozyteninfiltrat, die Hirnpathologie und den klinischen Verlauf (Hoegen, T. et al., 2011). Eine Übersicht über die Detektion von PAMPs gibt Abbildung 3.

Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 eine besondere Rolle bei der Pneumokokkenmeningitis spielen: Infizierte TLR2-TLR4-doppel-defiziente Mäuse entwickelten eine um 50 % geringere Liquorpleozytose als infizierte Wildtyp-Mäuse. Fehlte TLR9 zusätzlich, so beeinflusste das die Entzündungsreaktion nicht weiter. Dagegen zeigten

Einleitung

Mäuse, denen entweder TLR2 oder TLR4 alleine fehlte, keinen Unterschied zu infizierten Wildtyp-Mäusen (Klein, M. et al., 2008).

Über verschiedene Signalkaskaden kommt es schließlich zur Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuklearfaktor kappa B). Eine wichtige Rolle in dieser Signalkaskade nimmt Myeloid-Differenzierung-Faktor 88 (MyD88) ein, ein wichtiges Adaptermolekül in der durch die TLR- und die Interleukin (IL)-1-Rezeptor Familie vermittelten Zellaktivierung. Koedel et al. beschrieben 2004 die essentielle Rolle von MyD88 bei der Pneumokokkenmeningitis: 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* zeigten MyD88-defiziente Mäuse eine deutlich reduzierte Entzündungsreaktion im Zentralnervensystem (ZNS), messbar durch eine verringerte Liquorpleozytose und eine geringere Expression von Zytokinen, Chemokinen und Komplementfaktoren. Überdies zeigten die MyD88-defizienten Tiere eine deutlich eingeschränkte Wirtsabwehr, was sich in höheren Bakterientitern in Blut und Gehirn widerspiegelte (Koedel, U. et al., 2004).

Durch die Aktivierung von NF- κ B wird schließlich die Expression verschiedener Gene gesteuert, welche für zahlreiche Immunmediatoren, einschließlich Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle, kodieren (Hatada, E. N. et al., 2000; Koedel, U. et al., 2002a; Tak, P. P. und Firestein, G. S., 2001; Tsuchiya, K. et al., 2007). Auf diese Weise kommt es zu einer Infiltration von Leukozyten, vor allem Granulozyten, aus dem Blut in den Liquorraum (Abbildung 2 und Abbildung 3).

Einleitung

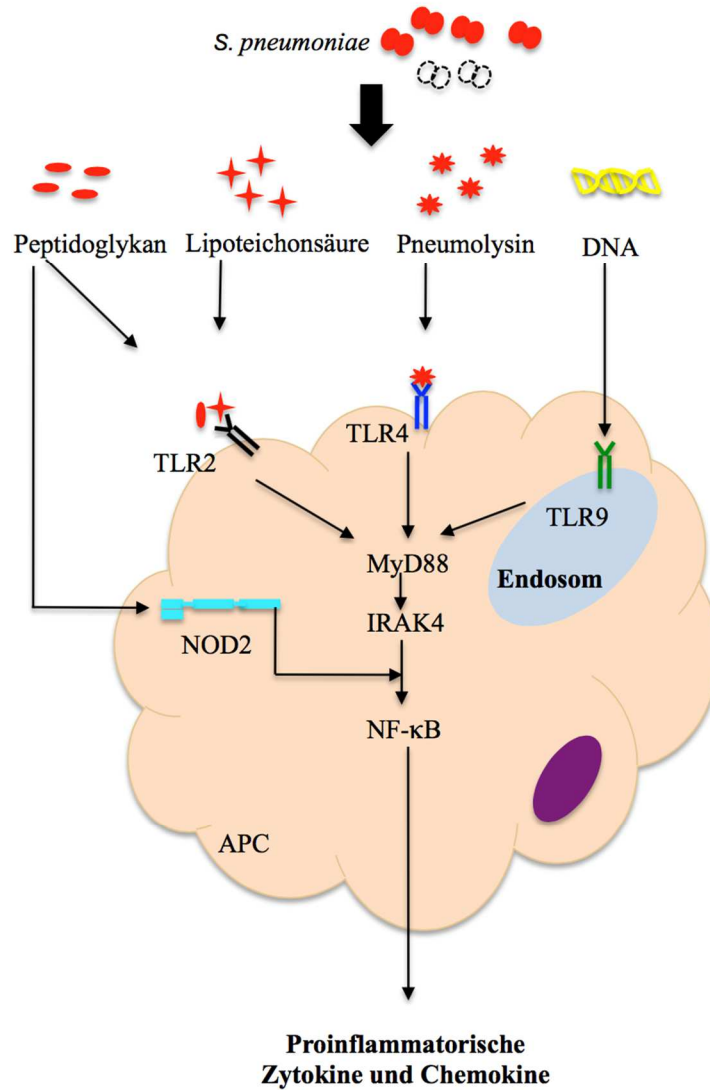


Abbildung 3: Übersicht über die Induktion einer Immunreaktion durch die Interaktion von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern mit Mustererkennungsrezeptoren

Bei der Autolyse der Pneumokokken werden subkapsuläre Zellwandbestandteile wie Peptidoglykan, Lipoteichonsäure (LTA), Pneumolysin (PLY) und bakterielle DNA freigesetzt. Diese Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) werden von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), unter denen Toll-like Rezeptoren (TLRs) und NOD-like Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen, erkannt. Über verschiedene Signalkaskaden, bei denen Myeloid-Differenzierung-Faktor 88 (MyD88) eine zentrale Position einnimmt, kommt es schließlich zur Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB, der die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine steuert. Anmerkung: APC = Antigen-präsentierende Zelle.

1.3.5 Verstärkung der Immunantwort durch körpereigene Immunmediatoren

Die Erkennung von PAMPs der eingedrungenen Keime durch Mustererkennungsrezeptoren wie TLR2 und TLR4 (Klein, M. et al., 2008) führt zur Produktion wichtiger proinflammatorischer Zytokine, unter denen die Interleukin (IL)-1 Familie von besonderer Bedeutung ist (Koedel, U. et al., 2004; Koedel, U. et al., 2002b). IL-1 β und IL-18, aktiviert durch die NLRP3/Caspase-1-Kaskade, dem NLRP3 Inflammasom, verstärken die inflammatorische Reaktion durch eine positive Rückkopplungsschleife, eine IL-1-Rezeptor-vermittelte, MyD88-abhängige Signalkaskade (Hoegen, T. et al., 2011; Witzénrath, M. et al., 2011; Zwijnenburg, P. J. et al., 2003). Infolgedessen kommt es zu einer massiven Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Blut in die Leptomeningen. Die eingedrungenen Neutrophilen sind allerdings nicht in der Lage die Pneumokokken zu eliminieren (Ernst, J. D. et al., 1983), stattdessen können sie Zellen in der Umgebung verletzen, indem sie schädigende Substanzen wie freie Radikale oder lysosomale Proteasen freisetzen können (Hoffmann, O. et al., 2007; Koedel, U. et al., 2009a).

1.3.6 Zentrale Mechanismen der Hirnschädigung

Die Gewebeuntergänge bei der Pneumokokkenmeningitis sind multifaktoriell bedingt. Zum einen können Pneumokokken Moleküle, wie z.B. Pneumolysin, freisetzen, welche zytotoxisch wirken (Hirst, R. A. et al., 2004). Zum anderen gilt die massive, oft protrahierte Immunreaktion als kausaler Faktor für die Schädigung neuronalen Gewebes (Koedel, U. et al., 2010b). Aktivierte Neutrophile können starke Oxidantien, wie z.B. Peroxynitrit, freisetzen, welche zytotoxische Effekte, u.a. DNA-Strangbrüche, haben und zur Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen beitragen können (Klein, M. et al., 2006). Neben Oxidantien setzen aktivierte Neutrophile auch direkt proteolytische Enzyme, wie die bereits genannten Matrixmetalloproteinasen, frei.

Die Freisetzung von Proteasen und Oxidantien in der akuten Phase der Entzündungsreaktion kann zu Endothelschäden und einer Dysfunktion des Endothels führen. Dies kann unter anderem zu einem Verlust der zerebralen Autoregulation und zu Störungen der Blut-Hirn-Schrankenfunktion und konsekutiv zum Hirnödem und/oder zerebrovaskulären Gefäßkomplikationen führen. Als Folge kommt es zu intrakranieller Druckerhöhung und zerebralen Perfusionsstörungen, was zu zerebraler Ischämie und Einklemmung führen kann (Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003; Kim, K. S., 2003; Klein, M. et al., 2006; Koedel,

U. et al., 2002a; Nau, R. und Bruck, W., 2002). Eine Übersicht über Entstehung und Folge der Komplikationen gibt Abbildung 4.

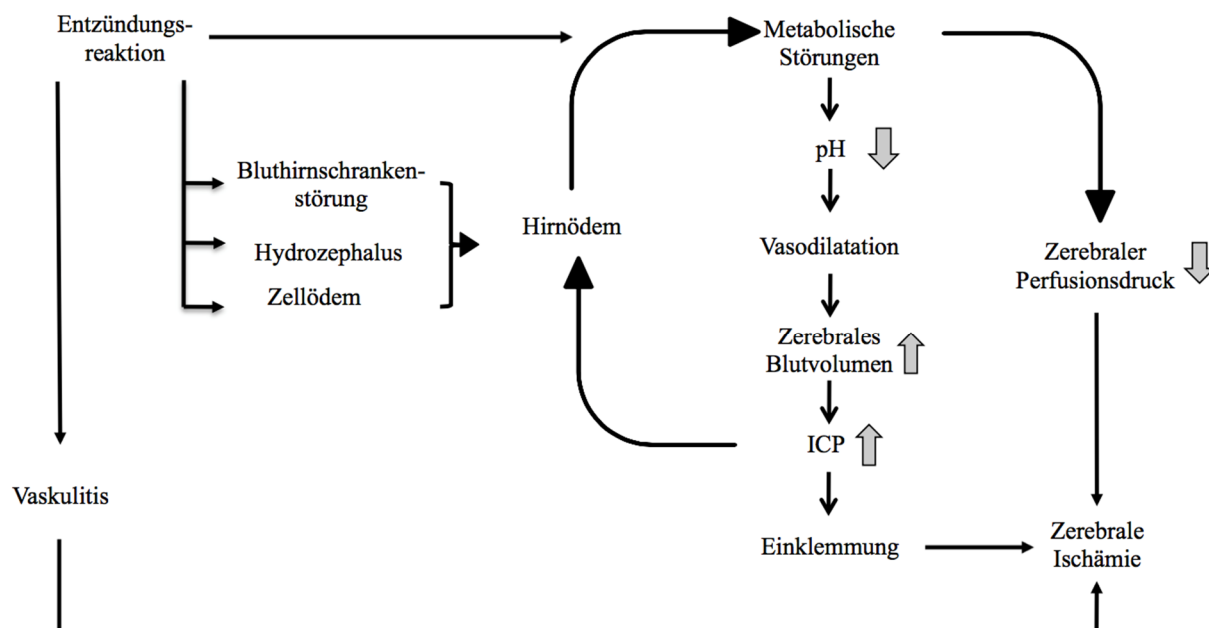


Abbildung 4: Circulus vitiosus der intrakraniellen Komplikationen der Pneumokokkenmeningitis (Koedel, U. et al., 2002a)

Anmerkung: ICP = intrakranieller Druck

1.3.6.1 Hirnödem und Steigerung des intrakraniellen Drucks

Im Rahmen der Blut-Hirn-Schrankenstörung treten osmotisch wirksame Plasmabestandteile in das ZNS über und verursachen ein vasogenes Ödem, welches den größten Teil des Hirnödems bei der Pneumokokkenmeningitis stellt (Fishman, R. A., 1975; Koedel, U. et al., 1994). Das sogenannte zytotoxische Ödem entsteht sowohl durch Ischämie als auch durch Toxine von Bakterien und Granulozyten. Durch transependymale Liquorverschiebungen von den Liquorräumen in das Hirnparenchym kann zudem ein interstitielles Ödem auftreten. Ursächlich hierfür können ein obstruktiver Hydrozephalus oder Liquorresorptionsstörungen sein (Klein, M. et al., 2011; Pfister, H. W. et al., 1993; Quagliarello, V. und Scheld, W. M., 1992; Scheld, W. M. et al., 1980).

Infolge eines Hirnödems kann es zu einem intrakraniellen Druckanstieg kommen. Jedoch führt ein Hirnödem nicht zwingend zum Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP). Auch ein erhöhtes zerebrales Blutvolumen kann ursächlich für einen erhöhten Hirndruck sein, z.B. bedingt durch eine gestörte zerebrale Autoregulation, eine inflammatorische Hyperämie

(Tureen, J. H. et al., 1990) oder im Rahmen einer Abflussstörung bei septischer Sinusthrombose (Pfister, H. W. et al., 1993).

1.3.6.2 Gefäßkomplikationen

Auch die zerebralen Gefäße sind bei der bakteriellen Meningitis in hohem Maße betroffen. Angiographisch und mittels Dopplersonographie konnten Gefäßwandunregelmäßigkeiten, arterielle Verschlüsse, Vasospasmen und kortikale- und Sinusvenenthrombosen nachgewiesen werden (Pfister, H. W. et al., 1992; Ries, S. et al., 1997). Bereits vor langer Zeit konnten in Autopsien von an Meningitis verstorbenen Patienten Arteriitiden und Thrombophlebitiden gefunden werden (Cairns, H. und Russell, D. S., 1946; Dodge, P. R. und Swartz, M. N., 1965).

Unter physiologischen Bedingungen unterliegt die zerebrale Perfusion bestimmten Autoregulationsmechanismen, die – unabhängig vom arteriellen Mitteldruck – einen konstanten Blutfluss zwischen 50 und 150 mmHg gewährleisten. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die zerebrovaskuläre Autoregulation im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung gestört sein kann (Koedel, U. und Pfister, H. W., 1997; Tureen, J. H. et al., 1990). Dadurch wird die Hirnperfusion abhängig vom Blutdruck: Bei niedrigem Blutdruck resultieren Minderperfusion und zerebrale Ischämie, bei hohem Blutdruck dagegen vermehrter zerebraler Blutfluss und Anstieg des intrakraniellen Drucks. Ein derartiger Verlust der Autoregulation konnte auch bei erkrankten Menschen nachgewiesen werden (Moller, K. et al., 2004; Paulson, O. B. et al., 1974).

1.3.7 Endogene Alarmsignale

Neben PAMPs können auch endogene Signale, sogenannte DAMPs (Schaden-assoziierte molekulare Muster = *damage-associated molecular patterns*), die durch Zellstress und Zellschaden freigesetzt werden, das Immunsystem aktivieren oder eine laufende Immunantwort modulieren (Kono, H. und Rock, K. L., 2008; Matzinger, P., 2007).

Diverse Studien haben gezeigt, dass bei Hirnschädigungen, die nicht durch Infektionen bedingt sind, z.B. bei zerebralen Ischämien oder Hirntraumata, Entzündungsreaktionen eine wichtige pathogenetische Rolle spielen. Verantwortlich für solche nicht-infektiöse Entzündungsreaktionen sind dabei Moleküle, die beim Zelluntergang aus dem körpereigenen

geschädigten Gewebe als endogene Alarmsignale freigesetzt werden (Bianchi, M. E., 2007; Gallucci, S. et al., 1999; Harris, H. E. und Rauti, A., 2006; Matzinger, P., 2002; 2007; Sauter, B. et al., 2000). In zellkulturellen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Makrophagen und dendritische Zellen von nekrotischen Zellen aktiviert werden können, indem sie endogene Alarmsignale freisetzen (Gallucci, S. et al., 1999; Sauter, B. et al., 2000). Zu solchen endogenen Alarmsignalen zählen zum Beispiel Hitzeschockproteine, endogene Nukleinsäuren, Harnsäurekristalle, IL-1 α , IL-33, S-100-Proteine und high mobility group box 1 protein (HMGB1). Sie gelangen beim Zelluntergang aus dem Intra- in den Extrazellulärraum und können dort Immunzellen aktivieren (Basu, S. et al., 2000; Bianchi, M. E., 2007; Foell, D. et al., 2007; Ishii, K. J. et al., 2001; Ni, H. et al., 2002; Scaffidi, P. et al., 2002; Shi, Y. et al., 2003). Einige Alarmsignale, wie z.B. HMGB1, können zudem von verschiedenen Zelltypen, z.B. von Makrophagen und Granulozyten, auch aktiv als Reaktion auf diverse Stressoren freigesetzt werden (Chen, G. et al., 2004; Dumitriu, I. E. et al., 2005a; Ryckman, C. et al., 2003; Voganatsi, A. et al., 2001; Wang, H. et al., 2004).

1.3.7.1 HMGB1 – ein endogenes Alarmsignal

HMGB1 ist ein bei allen Säugetieren ubiquitär vorkommendes Protein (Bustin, M. et al., 1990). Das menschliche HMGB1-Gen ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert und kodiert ein aus 216 Aminosäuren bestehendes Protein (Ferrari, S. et al., 1996; Stros, M. und Dixon, G. H., 1993; Wen, L. et al., 1989). HMGB1 ist ein 30 kDa-Protein und besteht strukturell aus drei Domänen: Zwei DNA-bindende Domänen, A-Box und B-Box, sowie einem negativ geladenen C-Terminus (Hardman, C. H. et al., 1995; Weir, H. M. et al., 1993) (Abbildung 5).

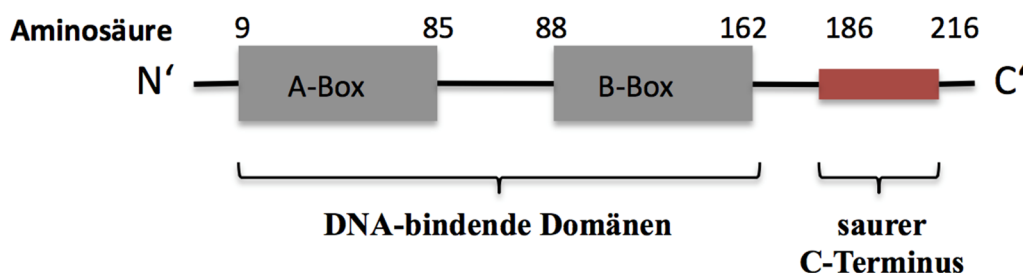


Abbildung 5: Struktur von HMGB1

Einleitung

HMGB1 kommt in vielen Zelltypen im Zellkern vor. Dort stabilisiert es in erster Linie die Nukleosomenformation und ist an der Regulation der Genexpression beteiligt (Bustin, M., 2002).

Seine Funktion als endogenes Alarmsignal verrichtet es, wenn es in den Extrazellulärraum gelangt (Abbildung 6). Die Freisetzung von HMGB1 kann auf zwei Mechanismen erfolgen: HMGB1 kann als Antwort auf PAMPs oder endogene Stimuli und proinflammatorische Zytokine von Zellen des angeborenen Immunsystems aktiv sezerniert werden (Andersson, U. und Tracey, K. J., 2011; Ivanov, S. et al., 2007; Rendon-Mitchell, B. et al., 2003; Tang, D. et al., 2007; Wang, H. et al., 1999). Die aktive Sekretion erfolgt über einen nicht-konventionellen, von Inflammasom- und Caspase-1-Aktivierung abhängigen Signalweg. (Lamkanfi, M. et al., 2010). Das Inflammasom ist ein Multiproteinkomplex, der die Aktivierung von Caspase-1 kontrolliert, welche die Spaltung von pro-IL-1 β in aktives IL-1 β katalysiert (Franchi, L. et al., 2009). Darüberhinaus kann HMGB1 passiv aus sterbenden Zellen infolge der Auflösung von Zellkern und Zellmembran freigesetzt werden (Bell, C. W. et al., 2006; Scaffidi, P. et al., 2002).

Extrazelluläres HMGB1 kann sich wie ein Zytokin verhalten. Es kann selbstständig und/oder durch Komplexbildung mit exogenen und endogenen proinflammatorischen Molekülen die Synthese von Zytokinen induzieren oder verstärken (Andersson, U. und Tracey, K. J., 2011; Bianchi, M. E., 2009). Zusätzlich kann HMGB1 chemotaktisch wirken und Granulozyten an den Entzündungsort rekrutieren (Berthelot, F. et al., 2012; Orlova, V. V. et al., 2007; Penzo, M. et al., 2010). Außerdem kann HMGB1 die Apoptose neutrophiler Granulozyten inhibieren, wie Feng et al. (2008) in einem Tiermodell der Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Lungenentzündung demonstrierten. Zudem beobachteten Liu et al. (2008), dass HMGB1 die Beseitigung apoptotischer Leukozyten verhindern kann. Makrophagen erkennen normalerweise apoptotische Zellen mittels Rezeptoren für Phosphatidylserin und eliminieren diese durch Phagozytose. Studien zeigten, dass HMGB1 mit Phosphatidylserin auf der Oberfläche apoptotischer Zellen interagieren kann und so deren Phagozytose hemmen kann (Liu, G. et al., 2008). Dadurch akkumulieren apoptotische und später dann nekrotische Zellen und führen so zur passiven Freisetzung von HMGB1 und verschiedener anderer DAMPs (Bell, C. W. et al., 2006; Liu, G. et al., 2008). Neben der Inhibierung der Apoptose von Neutrophilen durch HMGB1 wird in der aktuellen Literatur auch eine Einschränkung der Bakterienelimination durch HMGB1 diskutiert: Tadie und Kollegen (2012) zeigten in *in vitro*-

Einleitung

Untersuchungen, dass HMGB1 einen negativen Effekt auf die Eradikation von *E.coli* durch neutrophile Granulozyten hat. In Übereinstimmung mit diesem Befund beobachtete diese Arbeitsgruppe überdies höhere *E. coli*-Titer in der Peritonealflüssigkeit von Mäusen nach gemeinsamer intraperitonealer Applikation von *E. coli* und HMGB1 als bei der Injektion von *E. coli* alleine. Entezari et al. (2012) fanden in Untersuchungen zur Zystischen Fibrose (CF) erhöhte HMGB1-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage von CF-Patienten; HMGB1 verhinderte dabei die Phagozytose von *Pseudomonas aeruginosa* durch Makrophagen. In deren Untersuchungen konnte durch den Einsatz von anti-HMGB1-Antikörpern die Bakterienlast in der Lunge reduziert werden.

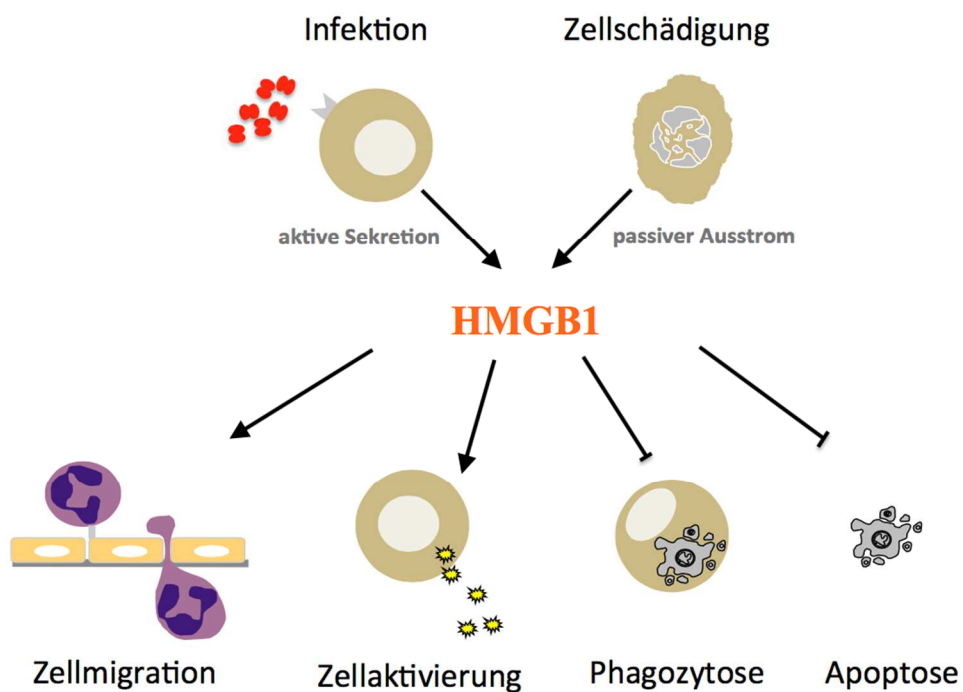


Abbildung 6: Freisetzung und Funktion von HMGB1

HMGB1 gilt als später Mediator der Sepsis (Lotze, M. T. und Tracey, K. J., 2005). Wang et al. beschrieben 1999 in einem Mausmodell der Endotoxämie zum ersten Mal die Bedeutung von HMGB1 in der Pathogenese dieser Erkrankung (Wang, H. et al., 1999). HMGB1 war erst acht Stunden nach Krankheitsbeginn nachweisbar, seine höchsten Konzentrationen erreichte es nach 16-32 Stunden (Wang, H. et al., 1999; Yang, H. et al., 2004). Dabei ging die Freisetzung von HMGB1 mit dem Tod der Tiere einher (Andersson, U. und Tracey, K. J., 2011). In einem Mausmodell der Sepsis fanden Yang und Kollegen (2004) erhöhte HMGB1-

Konzentrationen 18 Stunden nach Induktion der Erkrankungen; erhöhte Spiegel waren auch noch 72 Stunden nach Erkrankungsbeginn nachweisbar. Eine Behandlung mit HMGB1-Antikörpern erhöhte die Überlebensraten der Versuchstiere bei Sepsis und Endotoxämie (Wang, H. et al., 1999; Yang, H. et al., 2004). Darüber hinaus zeigten sich nach systemischer Applikation von gereinigtem HMGB1 viele klinische Zeichen der Sepsis (Wang, H. et al., 1999).

Auch klinische Studien weisen auf eine besondere Rolle von HMGB1 bei Entzündungsreaktionen hin: Bei 25 Patienten mit Sepsis-assoziierten Organschäden konnten erhöhte HMGB1-Konzentrationen nachgewiesen werden; dabei zeigten sich höhere HMGB1-Konzentrationen bei Patienten, die im Verlauf an der Krankheit verstarben (Wang, H. et al., 1999). Im Gehirn verstärkt die Applikation von rekombinantem HMGB1 die Expression von IL-1 β und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), wirkt prokonvulsiv und vermittelt Anorexie, Fieber und Gedächtnisdefizite (Agnello, D. et al., 2002; Maroso, M. et al., 2010; Mazarati, A. et al., 2011). Weiterhin wurde endogenes HMGB1 als früher, postischämischer und posttraumatischer Entzündungsmediator identifiziert; für Antagonisten von HMGB1 konnte in diesem Zusammenhang eine neuroprotektive Wirkung im Tiermodell nachgewiesen werden (Liu, K. et al., 2007; Muhammad, S. et al., 2008; Su, X. et al., 2011). Diese Daten verdeutlichen eine besondere Beteiligung von HGMB1 bei der sterilen Neuroinflammation und Neurodegeneration. Dagegen ist dessen Rolle bei Infektionskrankheiten des Gehirns bisher noch weitgehend unbekannt. Kürzlich berichteten zwei Fallstudien von erhöhten HMGB1-Konzentrationen im Liquor von Kindern mit bakteriellen Meningitiden (Asano, T. et al., 2011; Tang, D. et al., 2008). Das Ziel dieser Studie war daher, anhand von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen den Mechanismus der Freisetzung von HMGB1 und dessen funktionelle Bedeutung für die Entwicklung und den Verlauf der Pneumokokkenmeningitis, einer schwerwiegenden Infektionserkrankung des Zentralnervensystems, zu untersuchen.

1.3.7.2 Rezeptoren von HMGB1

Die Effekte von HMGB1 werden über Toll-like Rezeptoren und den „*receptor for advanced glycation end products*“ (RAGE) vermittelt (Hori, O. et al., 1995; Yu, M. et al., 2006).

RAGE, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, stellt einen transmembranen Multiligandenrezeptor an der Zelloberfläche dar (Hori, O. et al., 1995). Durch Bindung an

RAGE induziert HMGB1 Zellwachstum und vermittelt chemotaktische Effekte, die Differenzierung und Migration von Immunzellen, die Migration von glatten Muskelzellen und die Hochregulation von Oberflächenrezeptoren wie RAGE und TLR4 (Dumitriu, I. E. et al., 2005b; Dumitriu, I. E. et al., 2007; Rouhiainen, A. et al., 2004; Silva, E. et al., 2007; Yang, D. et al., 2007).

Van Zoelen et al. wiesen 2009 eine bedeutende Rolle von RAGE in einem Tiermodell der Pneumokokken-Pneumonie nach (van Zoelen, M. A. et al., 2009a): Sie fanden nach Induktion einer Pneumonie eine verstärkte Expression von RAGE im Lungengewebe. RAGE-defiziente Mäuse zeigten ein verbessertes Überleben; dieser Effekt ging mit einer niedrigeren Bakterienlast in der Lunge 16 Stunden nach Infektion und niedrigerer bakterieller Dissemination in Milz und Blut 18-48 Stunden nach Infektion einher. Zudem fand bei RAGE-defizienten Mäusen eine verminderte Migration von Neutrophilen in die Lungen statt.

Bei der HMGB1-induzierten Zytokinfreisetzung spielt zudem der Toll-like Rezeptor 4 eine zentrale Rolle: RAGE-defiziente Makrophagen und TLR2-defiziente Makrophagen produzierten nach Exposition mit HMGB1 TNF- α , nicht aber TLR4-defiziente Makrophagen (Yang, H. et al., 2010). TLR2 und -4 sind beide bei der Aktivierung von NF- κ B, einem proinflammatorischen Transkriptionsfaktor (siehe 1.3.4) durch HMGB1 involviert (Park, J. S. et al., 2004). Untersuchungen zur Zytokinfreisetzung weisen auf eine differenzierte Beteiligung von TLR2 und -4 hin: So konnten im menschlichen Vollblut neutralisierende Antikörper gegen TLR4, nicht aber gegen TLR2 und RAGE, dosisabhängig eine HMGB1-induzierte IL-8-Freisetzung abschwächen. Yu et al. (2006) zeigten, dass bei primären menschlichen Makrophagen eine HMGB1-induzierte TNF-Freisetzung durch anti-TLR4-Antikörper inhibiert werden kann. HMGB1 bewirkte eine signifikant geringere TNF- α -Freisetzung von Makrophagen MyD88- und TLR4-defizienter Mäuse als von Wildtyp- und TLR2-defizienten Mäusen. Jedoch induzierte HMGB1 nur bei TLR2-transfizierten embryonalen Nierenzellen eine IL-8-Freisetzung, die sich durch anti-TLR2-Antikörper vermindern ließ, nicht aber in TLR4-transfizierten Zellen (Yu, M. et al., 2006). Park et al. (2006) untersuchten mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer die direkte Interaktionen an der Zelloberfläche zwischen HMGB1 und TLR2, TLR4 und RAGE. Dabei zeigten sie in Untersuchungen an RAW264.7-Makrophagen eine Assoziation von HMGB1 mit TLR2 und TLR4, nicht aber mit RAGE. Nach Transfektion in menschliche embryonale Nierenzellen induzierte HMGB1 durch TLR2 und TLR4, nicht aber durch RAGE, Zellaktivierung und NF-

Einleitung

kB-abhängige Transkription. Van Zoelen et al. (2009b) zeigten, dass die HMGB1-induzierte Zytokinfreisetzung, Gerinnungsaktivierung und Neutrophilen-Rekrutierung zumindest zum Teil von TLR4 und RAGE abhängt: Bei TLR4- und bei RAGE-defizienten Mäusen fanden sich 2 Stunden nach intraperitonealer Applikation von HMGB1 geringere TNF- α - und IL-6-Konzentrationen in deren peritonealer Lavage-Flüssigkeit, verglichen mit Wildtyp-Mäusen; dagegen ließen sich bei TLR2-defizienten Mäusen deutlich höhere Konzentrationen nachweisen.

Diese Daten machen deutlich, dass zur Charakterisierung der komplexen Rezeptorinteraktionen von HMGB1 weitere Studien benötigt werden.

2 Fragestellungen

Die massive, oft protrahierte Immunreaktion gilt als zentraler kausaler Faktor für die Schädigung neuronalen Gewebes bei der Pneumokokkenmeningitis (Kim, K. S., 2003; Klein, M. et al., 2006; Koedel, U. et al., 2002a; Nau, R. und Bruck, W., 2002). Immunologische Untersuchungen der letzten Jahre haben demonstriert, dass bei Gewebeschäden verschiedene endogene Alarmsignale, wie zum Beispiel HMGB1, freigesetzt werden, die eine akute Entzündungsreaktion initiieren und modulieren können (Harris, H. E. und Raucci, A., 2006; Matzinger, P., 2002; 2007; Scaffidi, P. et al., 2002). In verschiedenen Studien wurde eine Rolle von HMGB1 bei der sterilen Neuroinflammation und Neurodegeneration demonstriert (Liu, K. et al., 2007; Muhammad, S. et al., 2008; Su, X. et al., 2011). Im Liquor von Kindern mit bakterieller Meningitis konnten erhöhte Konzentrationen von HMGB1 nachgewiesen werden (Asano, T. et al., 2011; Tang, D. et al., 2008). Die funktionelle Rolle von HMGB1 bei Infektionskrankheiten des zentralen Nervensystems ist noch weitgehend unbekannt. Daraus ergaben sich folgende Ziele dieser Arbeit:

- 1) Charakterisierung der Freisetzung von HMGB1 im Krankheitsverlauf der Pneumokokkenmeningitis.
- 2) Analyse der funktionellen Bedeutung von HMGB1 als endogenes Alarmsignal und der Auswirkung von HMGB1-Antagonisten bei der Regulation der Entzündungsreaktion und der Entstehung Meningitis-assoziiierter intrakranieller Komplikationen.
- 4) Untersuchung des Wirkmechanismus von HMGB1.
- 5) Charakterisierung der Rolle von RAGE als möglichen Rezeptor der HMGB1-vermittelten Effekte.

3 Material und Methoden

Eine ausführliche Auflistung der im Rahmen dieser Untersuchungen verwendeten Materialien befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

3.1 In-vitro Versuche

3.1.1 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen fand in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und 5 %-iger CO₂-Begasung statt. Mediumwechsel, Passagieren von Zellen und Versuchsansätze wurden ausschließlich unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.1.2 Zelllinien und primäre Zellen

3.1.2.1 J774.2-Makrophagen

Bei den J774.2-Zellen (*Health Protection Culture Collections*, Salisbury, UK) handelt es sich um semiadhärente Makrophagen-ähnliche Zellen, die einem Retikulumzellsarkom einer Balb/c-Maus entstammen (Ralph, P. et al., 1975). Zur Kultivierung dieser Zelllinie wurde DMEM (*Dublecco's modified Eagle medium*; #D5796, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), dem Endotoxin-freies, fetales bovines Serum (FBS, Konzentration im Medium 10 Volumenprozent) und Penicillin/Streptomycin (P/S, Konzentration im Medium 1 Volumenprozent) zugesetzt worden war, verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 250 ml-Zellkultur-Flaschen in 25 ml DMEM-Medium. Alle 48 Stunden wurden die adhärennten Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst; anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (bei 900 Umdrehungen/Minute [UPM] und 15 °C für 10 min in einer Hermle Z360K-Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml frischem Medium mit Hilfe eines Rüttelmixers resuspendiert. Von der neuen Zellsuspension wurde 1 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt und 24 ml frisches Medium hinzugegeben.

3.1.2.2 Hoxb8-Granulozyten

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um konditional mit er-Hoxb8 (*Estrogen-reguliertem* Hoxb8) immortalisierte Knochenmarksvorläuferzellen, die aus weiblichen C57BL/6-Mäusen gewonnen worden waren (Koedel, U. et al., 2009a; Wang, G. G. et al., 2006). Die Expression des Transkriptionsfaktors Hoxb8 (Homeobox B8) verhindert die Ausdifferenzierung der myeloischen Progenitorzellen, fördert aber deren Proliferation. (Blatt, C. et al., 1988; Knoepfler, P. S. et al., 2001). Um die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors exogen modulieren zu können, hatten Wang et al. die Östrogenrezeptordomäne mit dem N-terminalen Ende von Hoxb8 fusioniert und die Aktivität von Hoxb8 von der Präsenz von Östrogen im Kulturmedium abhängig gemacht (Wang, G. G. et al., 2006).

Die Vorläuferzellen wurden in Optimem Medium mit FBS (Konzentration im Medium 10 Volumenprozent), 30 μ M β -Mercaptoethanol, P/S (Konzentration im Medium 1 Volumenprozent), Medium-Überstand einer Stammzell-Faktor (SCF)-produzierenden Zelllinie (Konzentration im Medium 4 Volumenprozent) und 1 μ M beta-Estradiol kultiviert. Der SCF-haltige Medium-Überstand wurde folgendermaßen gewonnen: SCF-produzierende „*chinese hamster ovary*“ (CHO)-Zellen wurden in Optimem-Medium, dem P/S (Konzentration im Medium 1 Volumenprozent), FBS (Konzentration im Medium 10 Volumenprozent) und 30 μ M β -Mercaptoethanol zugesetzt worden war, kultiviert. Wenn zwei Drittel des Bodens der Zellkulturflasche von den adhärent wachsenden CHO-Zellen besetzt waren, wurde das Medium abgenommen, zentrifugiert (3000 UPM, Raumtemperatur, 5 min), aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Die Hoxb8-Zellen wurden in 6-Loch-Platten in 3 ml Zellmedium pro Vertiefung kultiviert, nach 24 Stunden im Verhältnis 1:1 geteilt und 1.5 ml frisches Medium hinzugegeben. 24 Stunden nach der Teilung erfolgte ein kompletter Mediumwechsel (Passagieren der Zellen): Dazu wurden die Zellen gepoolt und zentrifugiert (900 UPM, 15 °C, 10 min). Im Anschluss wurde das alte Medium verworfen und das Zellpellet in 2 ml frischem Medium (s.o.) resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden je 250 μ l in frische Vertiefungen pipettiert und je 2.75 ml Medium pro Vertiefung hinzugefügt. Die Ausdifferenzierung der immortalisierten Vorläuferzellen wird unter Punkt 3.1.3.2 beschrieben.

3.1.2.3 Knochenmarks-Makrophagen

Zur Herstellung von primären Makrophagenkulturen wurden Wildtyp-Mäuse und ASC-

defiziente Mäuse (ASC = *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*; dankenswerterweise von Prof. V.M. Dixit, San Francisco, Kalifornien, USA zur Verfügung gestellt) verwendet (Hoegen, T. et al., 2011). Der Einsatz der ASC-defizienten Mäuse diente der Charakterisierung der Rolle des Inflammasoms bei der Freisetzung von HMGB1. Das Inflammasom setzt sich aus einem Rezeptorprotein, welches eine Nukleotid-bindende Domäne und Leucin-reiches Genprodukt (NLR) enthält, wie das NLRP3, und einem Adapter-Protein, nämlich ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), zusammen. ASC wiederum ermöglicht die Interaktion des NLR-Proteins mit der Vorläuferform der Caspase-1 (Lamkanfi, M. und Dixit, V. M., 2014; Strowig, T. et al., 2012).

Die Knochenmarks-Makrophagen wurden aus *Femures* von C57BL6/n-Mäusen gewonnen. Dazu wurden die Tiere durch Inhalation eines Gemisches aus 3.5 % Isofluran und Sauerstoff mittels eines Verdampfers (Vaporisateurs) in einer Plexiglas-Kammer narkotisiert und unmittelbar im Anschluss euthanasiert. Unter einer Sicherheitswerkbank wurden beide *Femures* freipräpariert und entnommen. Anschließend wurde jeder *Femur* mit 5 ml gekühlter steriler PBS durchspült und das Knochenmark in einem 50 ml Falcon aufgefangen. Nach Zerkleinerung der Gewebestücke durch Auf- und Abpipettieren und Rüttelmixen wurden verbliebene größere Zellverbände durch Filtration durch eine Membran mit einer Porengröße von 70 µm entfernt. Diese Suspension wurde abermals zentrifugiert (für 5 min bei 1500 UPM und 4 °C) und der Überstand anschließend verworfen. Durch Zugabe hypotoner NaCl-Lösung (3 ml einer 0.2 %-igen Lösung) wurden die im Zellpellet enthaltenen Erythrozyten lysiert. Nach 40 sec wurde der Lysevorgang durch Hinzufügen von 7 ml einer 1.2 %-igen NaCl-Lösung gestoppt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml steriler PBS resuspendiert und vorsichtig auf einen Percoll-Gradienten (Zusammensetzung: 80.15 %-ige Percoll-Lösung und 57.08 %-ige Percoll-Lösung) in einem 15 ml Falcon aufgetragen. Nach einer weiteren Zentrifugation (für 30 min bei 2300 UPM und 4 °C, ohne Bremse) waren 2 Banden identifizierbar: Die obere Bande wurde von mononukleären Zellen gebildet, die untere von Neutrophilen. Die mononukleären Zellen wurden sorgfältig abpipettiert, erneut zentrifugiert (für 5 min bei 1500 UPM und 4 °C) und anschließend in 10 ml Makrophagen-Medium aufgenommen (DMEM #D6429 [Sigma-Aldrich Chemie GmbH], 50 ng/ml rM-CSF [= Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor], 10 Vol.-% FBS, 10 mM HEPES-Puffer, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) und in eine Petrischale (100 mm Durchmesser) gegeben. Nach einem Tag wurde die Zellsuspension abpipettiert und in eine frische Petrischale transferiert. Am vierten Tag wurde das Zellkulturmedium ersetzt. Am

siebten Tag wurden die adhärennten Zellen durch eine 10-minütige Inkubation mit Accutase® vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen übertragen. Untersuchungen im Durchflusszytometer zeigten, dass nach 7 Tagen regelhaft über 98 % der Zellen den Makrophagenmarker CD11b exprimierten.

3.1.2.4 Knochenmarks-Neutrophile

Neutrophile Granulozyten wurden wie unter Punkt 3.1.2.3 aus den *Femures* von Wildtyp- und RAGE-defizienten Mäusen isoliert. Nach der Percoll-Zentrifugation wurde die untere, vornehmlich von Neutrophilen gebildete Bande in ein 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert, durch Zugabe von PBS das Volumen dieser Zellsuspension auf 10 ml aufgefüllt, und anschließend das Falcon-Röhrchen für 5 min bei 1500 UPM und 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen in 3 ml Medium (Optimem und 1 Vol.-% FBS) resuspendiert. Nun wurde die Zellkonzentration dieser Suspension durch Auszählung in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt und folglich durch Zugabe von Medium auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde in den anschließenden Chemotaxie-Untersuchungen eingesetzt (siehe Punkt 3.1.6).

3.1.3 Zellkulturexperimente

3.1.3.1 J774.2-Makrophagen

Vor Durchführung der Experimente wurde das Kulturmedium durch ein sogenanntes Stimulationsmedium ersetzt: Dazu wurden die Zellen in Falcon-Röhrchen transferiert, zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in DMEM und Nutridoma SP, einem serumfreien Mediumzusatz (Konzentration im Medium 1 Volumenprozent) und P/S (Konzentration im Medium 1 Volumenprozent) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter Punkt 3.1.4 beschrieben ausgezählt und in einer Konzentration von 100.000 Zellen pro Vertiefung (200 µl) in eine 96-Loch-Platte eingebracht und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen unterschiedlichen Konzentrationen an Hitze-inaktivierten (bei 60 °C für 60 min), kapsellosen isogenen Mutanten von *S. pneumoniae* (D39Δcps Stamm) für unterschiedliche Zeit ausgesetzt. Durch die Hitze-Inaktivierung werden die Bakterien abgetötet. Dadurch kann eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch Unterschiede im

bakteriellen Wachstum und der bakteriellen Lyse vermieden werden. Die unbekapselte Mutante musste verwendet werden, da bekapselte Stämme nach Hitze-Inaktivierung inflammatorisch inert sind, d.h. keine Immunreaktion auslösen können (Tuomanen, E. et al., 1985), da die Kapsel durch die Hitze-Einwirkung zusammenschrumpft und eine Freisetzung der proinflammatorischen bakteriellen Komponenten aus dem Inneren zu verhindern scheint, selbst aber nicht proinflammatorisch wirkt. Die Bakterien wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt von der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt.

In weiteren Experimenten zur Charakterisierung der Freisetzungsmechanismen von HMGB1 wurden dem Kulturmedium folgende Substanzen und Hemmstoffe beigefügt: Carbobenzoxymethyl-L-alanyl-L-aspartyl-L-[O-methyl]-fluoromethylketon (z-YVAD-fmk; 50 μ M), Kaliumchlorid (KCl, 65 mM), oxidiertes Adenosin-Triphosphat (ox-ATP, 0.01, 0.1 und 1 mM), A438079 (1, 10 und 100 μ M), Diphenyleneiodonium (DPI, 10 μ M), N-Acetyl-L-Cystein (NAC, 2.5 mM), Manganese(III)tetrakis(4-Benzoesäure)Porphyrin (MnTBAP, 50 μ M) und Ethylpyruvat (1 mM, 10 mM). Eine Beschreibung der Wirkung dieser Substanzen findet sich unter Abschnitt 4.5.

3.1.3.2 Hoxb8-Granulozyten

Durch den Entzug von Östrogen können Hoxb8-Vorläuferzellen in neutrophile Granulozyten ausdifferenziert werden (Wang, G. G. et al., 2006). Dazu wurden die immortalisierten Vorläuferzellen in Falcon-Röhrchen überführt, zentrifugiert und das entstandene Zellpellet anschließend in 2 ml frischem Estradiol-freien Medium (Optimem Medium, dem FBS [Konzentration im Medium 10 Volumenprozent], 30 μ M β -Mercaptoethanol, P/S [Konzentration im Medium 1 Volumenprozent] und Medium-Überstand einer (SCF)-produzierenden Zelllinie [Konzentration im Medium 4 Volumenprozent] zugesetzt worden war) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen ausgezählt und durch Zugabe von Medium die Zellkonzentration auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden jeweils 3 ml in die Vertiefungen einer 6-Loch-Platte eingebracht und bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Die Ausdifferenzierung dauerte fünf Tage; dabei entstehen aus 3×10^5 Vorläuferzellen (pro Vertiefung) ca. 3×10^6 Neutrophile. Die ausdifferenzierten Neutrophilen wurden für die Chemotaxie-Experimente (siehe Punkt 3.1.6) verwendet. Dazu wurden die Granulozyten gepoolt und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml Medium

aus Optimum Medium, FBS (Konzentration im Medium 1 Volumenprozent), 30 µM β-Mercaptoethanol und SCF (Konzentration im Medium 4 Volumenprozent) resuspendiert und ausgezählt. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 2 Millionen Zellen/ml eingestellt und davon jeweils 50 µl in die Vertiefungen einer 48-Loch-Mikrochemotaxie-Kammer, wie unter Punkt 3.1.6 beschrieben, verteilt.

3.1.3.3 Knochenmarks-Makrophagen

Die Isolation von Makrophagen aus dem Knochenmark wurde unter Punkt 3.1.2.3 beschrieben. Nach 7 Tagen wurde das Kulturmedium durch Makrophagen-Medium ohne rM-CSF und P/S ersetzt, die Zellen in eine 96-Loch-Platte eingebracht und 24 Stunden später mit *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39-Stamm) stimuliert.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl und Differenzierung vitaler von toten Zellen wurde der Farbstoff Trypanblau (Trypan-Blau Lösung 0.4 %) verwendet. Dabei handelt es sich um einen anionischen Farbstoff, der selektiv im Zytoplasma toter Zellen verbleibt und diese dadurch tiefblau anfärbt. Vitale Zellen sind dagegen in der Lage, den Farbstoff aktiv aus der Zelle auszuschleusen und erscheinen daher im mikroskopischen Bild hell.

Zur Färbung wurden 20 µl Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau-Lösung gemischt und 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurde diese Zellsuspension in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben und lichtmikroskopisch (Leica LEITZ DM IL) die Anzahl vitaler Zellen ermittelt. Dabei wurden die Zellen eines Großquadrates (bestehend aus 16 Einzelquadraten) gezählt und die Zellzahl/µl nach folgender Formel berechnet:

$$X = \frac{N * VF}{T}, \text{ wobei:}$$

1. $x = \text{Leukozytenzahl}/\mu\text{l}$
2. $N = \text{gezählte Leukozytenzahl in einem Großquadrat}$
3. $VF = \text{Verdünnungsfaktor; hier 5 bei 1:5 Verdünnung}$
4. $T = \text{Kammertiefe } 0,2 \text{ mm}$

3.1.5 Messung der LDH-Aktivität

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der kommerzielle „*LDH Cytotoxicity Assay Kit II*“ von *Biovision* verwendet. Dieser Test dient der Bestimmung der extrazellulären Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH). Die LDH ist ein Enzym im Zytoplasma aller Zellen. Bei Zelluntergang und Plasmamembranschäden wird es rasch in die Umgebung freigesetzt. Damit dient dieser Test der Quantifizierung von Zelluntergang und -schädigung. Im Folgenden soll das Testprinzip kurz beschrieben werden: Freigesetztes LDH reduziert bei der Oxidation von Laktat zu Pyruvat NAD^+ zu NADH/H^+ . NADH/H^+ reagiert mit einem Tetrazolium-Salz-Substrat (wasserlösliches Tetrazolium-Salz; WST) und generiert eine Gelbfärbung, deren Absorption gemessen werden kann. Diese Färbung korreliert direkt mit der Anzahl der lysierten Zellen.

Die Messung der LDH-Aktivität mittels „*LDH Cytotoxicity Assay Kit II*“ wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde der Zellkultur-Überstand (Ü) zunächst bei 600 g für 10 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 R). Anschließend wurden 10 µl des Überstandes in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert. Nach Zugabe von 100 µl der Reaktionsmischung, bestehend aus dem WST-Substrat und LDH-Assay-Puffer, wurde die Suspension 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm mit einem Mikroplattenleser gemessen. Als Hintergrundkontrolle diente reines Zellkulturmedium (Negativkontrolle, NK). Als Positivkontrollen (PK) wurden mit Triton X-100 (*t*-Octylphenoxypolyethoxyethanol) lysierte Zellen verwendet. Die Zytotoxizität wurde als der prozentuale Anteil des Verhältnisses $\frac{\text{Ü}-\text{NK}}{\text{PK}-\text{NK}} \times 100$ berechnet.

3.1.6 Chemotaxie-Untersuchungen in vitro

In früheren Studien wurde eine chemotaktische Wirkung von HMGB1 gezeigt, die vornehmlich durch dessen Interaktion mit RAGE vermittelt wurde (Berthelot, F. et al., 2012; Kokkola, R. et al., 2005; Penzo, M. et al., 2010). Um diesen möglichen Wirkmechanismus von HMGB1 zu untersuchen, wurde der chemotaktische Effekt auf Hoxb8-Granulozyten überprüft.

Dabei wurde eine 48-Loch-Mikrochemotaxie-Kammer, auch Boyden-Kammer genannt, verwendet (Koedel, U. et al., 1999; Woehrl, B. et al., 2010). Durch einen

Polyvinylpyrrolidon-freien Mikroporenfilter aus Polycarbonat mit einer Porengröße von 5 µm wird jede der 48 Vertiefungen in eine obere und eine untere Kammer unterteilt. In die obere Kammer wurden die ausdifferenzierten Hoxb8-Granulozyten (50 µl; 2×10^6 Zellen/ml in einem Optimum Medium mit 1 % FBS, 4 % SCF, und 30 µM β-Mercaptoethanol) gegeben, entweder unbehandelt oder 1 Stunde vor Durchführung des Chemotaxie-Assays mit einem RAGE-blockierenden Antikörper oder dessen Kontroll-Isotyp-Antikörper (beide jeweils 25 µg/ml) behandelt. Rekombinantes HMGB1 (rHMGB1) wurde in RPMI 1640 Medium mit 1 % FBS gelöst und jeweils 25 µl der Konzentrationen 5 µg/ml, 0.5 µg/ml und 0.05 µg/ml in die untere Kammer eingebracht. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die untere Kammer mit 5 µg/ml an rekombinantem HMGB1 und 50 µg/ml eines Hühner-anti-HMGB1-Antikörpers versehen. In zusätzlichen Experimenten wurden Neutrophile, die aus dem Knochenmark von RAGE-defizienten oder Wildtyp-Mäusen gewonnen worden waren, anstelle von Hoxb8-Neutrophilen eingesetzt (siehe Punkt 3.1.2.4).

Nach 120 Minuten wurden die Filter entfernt, mit Methanol fixiert und mittels *DiffQuik*-Färbekit (Baxter Diagnostics AG) gefärbt. Anschließend wurden unter dem Lichtmikroskop die Granulozyten auf der Unterseite der Filtermembran in 10 willkürlich gewählten Gesichtsfeldern gezählt. Die Zellmigration wurde als Mittelwert der pro Feld migrierten neutrophilen Granulozyten angegeben. Für die Negativkontrollen wurde die untere Kammer lediglich mit 25 µl RPMI plus 1 % FBS gefüllt. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes CXCL2 (rCXCL2) in den Konzentrationen 5, 0.5 und 0.05 ng/ml (gelöst in RPMI und 1 % FBS) verwendet.

3.2 Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis

Um die Rolle von HMGB1 in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis zu untersuchen, wurde ein etabliertes Mausmodell verwendet (Koedel, U. et al., 2009a; Woehrl, B. et al., 2011). Eine Übersicht darüber geben Abbildung 7 und Abbildung 8.

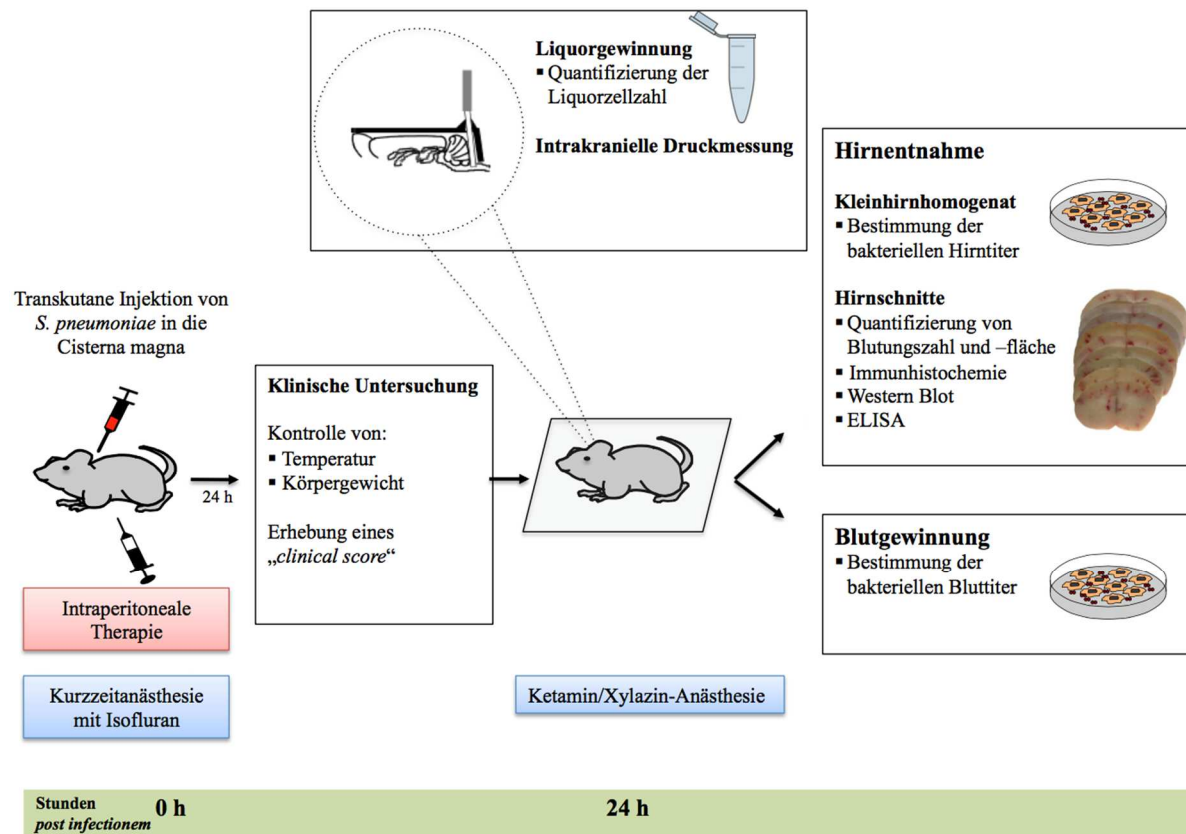


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Mausmodells der Pneumokokkenmeningitis im 24-Stunden-Versuch

Zu Beginn wurden alle Versuchstiere einer Eingangsuntersuchung unterzogen, im Anschluss erfolgte die intrazisternale Infektion mit *S. pneumoniae*. Unmittelbar danach wurde die Therapie mit HMGB1-Antagonisten bzw. mit deren Vehikeln durchgeführt. 24 Stunden nach Infektion fanden eine erneute klinische Evaluation und daran anschließend die Präparation statt.

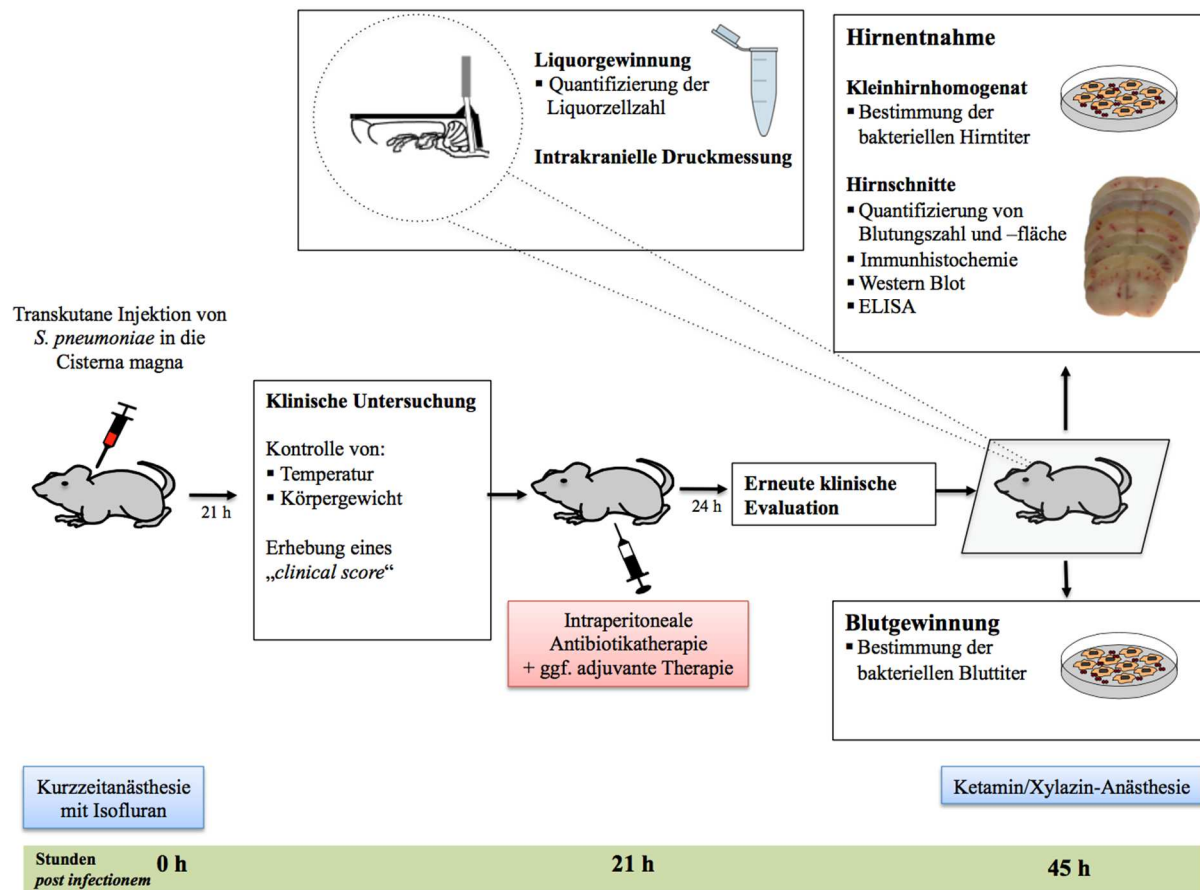


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Mausmodells der Pneumokokkenmeningitis im 45-Stunden-Versuch

Zunächst wurden alle Versuchstiere einer Eingangsuntersuchung unterzogen, im Anschluss erfolgte die intrazisternale Infektion mit *S. pneumoniae*. Nach 21 Stunden fand eine erneute klinische Evaluation statt. Im Anschluss daran wurde intraperitoneal die antibiotische Therapie mit Ceftriaxon, sowie je nach Versuchsserie die adjuvante Therapie aus HMGB1-Antagonisten bzw. aus deren Vehikeln appliziert. 24 Stunden nach Therapiebeginn, also 45 Stunden nach der Infektion, erfolgte eine erneute klinische Evaluation und im Anschluss die Präparation.

3.2.1 Tierversuchsgenehmigung

Diese Studie erfolgte unter strikter Einhaltung der Richtlinien zur Behandlung und Verwendung von Labortieren („Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA) und des Deutschen Tierschutzgesetzes.

Die Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 55.2-1-54-2531-31-09).

3.2.2 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden C57BL/6-Mäuse von Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die RAGE-defizienten und TLR2/4-doppel-defizienten Mäuse, die jeweils 10-fach auf den genetischen Hintergrund der C57BL/6-Mäuse rückgekreuzt waren, wurden von unseren Kooperationspartnern bezogen: RAGE^{-/-}-Mäuse von Frau Prof. Dr. Angelika Bierhaus von der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg, TLR2/4^{-/-}-Mäuse von Herrn Prof. Dr. Carsten Kirschning vom Universitätsklinikum Essen.

3.2.3 Klinische Untersuchung und klinischer Score

Die Tiere wurden vor der Infektion und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Versuche einer klinischen Untersuchung unterzogen. Dabei wurden das Gewicht der Tiere mit einer Waage und die Körpertemperatur mit einer rektalen Temperatursonde gemessen. Anschließend wurde die spontane motorische Aktivität bestimmt. Dazu wurde die zu untersuchende Maus in eine Plastikbox gesetzt, deren Bodenfläche in 9 gleich große quadratische Felder unterteilt war, 2 Minuten lang beobachtet und die dabei betretenen Felder gezählt.

Zur Beurteilung des klinischen Status der Versuchstiere wurde ein modifiziertes Punktesystem verwendet (Garcia, J. H. et al., 1995). Dieser klinische Score beinhaltet [i] die Fähigkeit der Tiere, auf einem Balken zu balancieren, [ii] die Beurteilung der posturalen Reflexe, während die Maus am Schwanz in die Luft gehalten wird, [iii] die Untersuchung der Vigilanz, [iv] das Auftreten von Anfällen und [v] das Vorhandensein von Piloerektion. Bei gesunden Tieren beträgt der Score 0 Punkte, maximal können 12 Punkte erreicht werden. Mäuse mit 11 oder mehr Punkten werden als terminal krank angesehen und aus ethischen Gründen euthanasiert. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte keine Maus innerhalb des Beobachtungszeitraumes einen Score-Wert über 10. Eine detaillierte Übersicht über die Punktevergabe gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Erhebung des klinischen Scores

Untersuchung	Bewertung [Punkte]						
	0	1	2	3	4	5	6
Vigilanz	Wach	Lethargisch					
Erfolgreiches Balancieren auf Balken mit zunehmenden Durchmessern (Ø)	Laufen auf 4,5 mm Ø	Stehen auf 4,5 mm Ø länger als 30 sek	Laufen auf 9 mm Ø	Stehen auf 9 mm Ø für länger als 30 sek	Laufen auf 13,5 mm Ø	Stehen auf 13,5 mm Ø länger als 30 sek	Kein Laufen oder Sitzen möglich
Posturale Reflexe	Alle 4 Extremitäten symmetrisch extended	Flexion des Rumpfes	Kreiseln	Keine motorische Aktivität			
Auftreten von Piloerektion	Nein	Ja					
Auftreten von Anfällen	Nein	Ja					

3.2.4 Infektion

Nach der klinischen Untersuchung wurden die Mäuse durch Inhalation eines Gemisches aus 3.5 % Isofluran und Sauerstoff mittels eines Verdampfers (Vaporisateurs) in einer Plexiglas-Kammer narkotisiert und mit 20 µl Pneumokokken-Suspension aus 10⁷ KBE/ml von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (Stamm D39) infiziert, die transkutan in die *Cisterna magna* injiziert wurde. Dazu wurde der Kopf zunächst um ca. 60° flektiert und eine Spritze (Braun Omnican® F 30G x ½'') auf das *Os occipitale* aufgesetzt. In kleinen Schritten nach kaudal tastend wurde nun die *Membrana atlanto-occipitalis* aufgesucht, durchstoßen und die Bakterien injiziert. Die Bakterien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt von der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt. Kontrolltieren wurde 20 µl Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) intrazisternal appliziert. Danach wurden die

Tiere zu zweit in Käfige gesetzt und durften aufwachen. Die Käfige wurden auf Heizkissen gestellt, alle Mäuse wurden mit Standardfutter und Wasser *ad libitum* versorgt.

3.2.5 Therapie

3.2.5.1 Antibiotische Therapie

Alle Tiere, die länger als 24 Stunden untersucht wurden, wurden 21 Stunden *post infectionem* im Anschluss an die klinische Untersuchung durch die intraperitoneale Gabe von 100 mg/kg Körpergewicht Ceftriaxon antibiotisch behandelt.

3.2.5.2 Pharmakologische Eingriffe in den Wirkmechanismus von HMGB1

Zur Untersuchung der Rolle von HMGB1 in der Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis wurden Mäuse mit bekannten HMGB1-Antagonisten behandelt. Im 24-Stunden-Versuch erfolgte die Gabe unmittelbar nach der Infektion. Im 45-Stunden-Versuch wurden die Inhibitoren 21 Stunden nach der Infektion zusammen mit Ceftriaxon gegeben.

Folgende Substanzen wurden als HMGB1-Antagonisten verwendet:

Ethylpyruvat

Ethylpyruvat ist ein stabiles lipophiles Derivat von Pyruvat (Yu, Y. M. et al., 2005) und gilt als der erste beschriebene pharmakologische Hemmstoff der HMGB1-Sekretion (Su, X. et al., 2011).

Ethylpyruvat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde in einer 98 %-Ringer-Ethylpyruvat-Lösung (REPS) verabreicht. Zur Herstellung von 100 ml REPS wurden 602 mg Natriumchlorid (NaCl), 41 mg Kaliumchlorid (KCl) und 26 mg Calciumchlorid-Dihydrat in 99.68 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst und anschließend 0.32 ml Ethylpyruvat-Lösung zugefügt.

Den Tieren der entsprechenden Gruppen wurden 50 mg/kg Körpergewicht REPS intraperitoneal verabreicht; die entsprechenden Tiere der Vehikelgruppe erhielten Ringerlaktat-Lösung (RLS; identisches Volumen). Zur Herstellung einer 100 ml-Lösung RLS wurden 602 mg NaCl, 41 mg Kaliumchlorid KCl, 26 mg Calciumchlorid-Dihydrat und 314 mg Natriumlactat in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Rekombinantes Box A Protein

Rekombinantes Box A Protein von HMGB1 kann mit funktionellem HMGB1 um Bindestellen auf der Zelloberfläche konkurrieren und so HMGB1-Effekte antagonisieren (Gong, Q. et al., 2009; Sitia, G. et al., 2007; Yang, H. et al., 2004).

Zur Herstellung der Injektionslösung wurden 3 mg rekombinantes Box A Protein mit 50 mM Hepes-Natrium (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfon-säure-Natriumsalz; pH 7.9), 500 mM NaCl und 0.5 mM 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethan (4,4'-DDT) in Lösung gebracht, anschließend aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Die Tiere der entsprechenden Gruppen erhielten 400 µg/Maus an rekombinantem Box A Protein intraperitoneal verabreicht. Die Mäuse der Vehikelvergleichsgruppe erhielten eine Lösung aus 50 mM Hepes-Natrium (pH 7.9), 500 mM NaCl und 0.5 mM 4,4'-DDT.

3.2.6 Behandlungen und Eingriffe am Versuchsende

Bei Versuchsende wurden die Tiere erneut klinisch evaluiert und im Anschluss mit 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde durch die Reaktion auf Schmerzreize kontrolliert. Dabei wurde der Maus kurz in den Schwanz gekniffen und auf Abwehrbewegungen und Veränderungen in der Atmung geachtet; bei Bedarf wurde Narkotikum nachinjiziert. Zeigte die Maus keine Reaktion auf Schmerzreize, wurde mit der Präparation begonnen.

Hierzu wurden die Mäuse mittels zweier Halterungen an beiden *Ossa temporales* und einer Klemme am *Os nasale* fixiert. Nach einer Lokalanästhesie mit Lidocain (Xylocain® 1 %) wurden das *Os parietale* und *interparietale* freipräpariert. In Verlängerung der *Sutura sagittalis* wurde im posterioren Anteil dieses Schädelknochens ein Bohrloch angelegt. Durch dieses wurde ein Katheter, der aus einer Kanüle (22G x 1¼'', 0,7 x 30 mm) hergestellt worden war, in die *Cisterna magna* eingeführt und Liquor abgenommen. Der Liquor wurde zur Zellzahlbestimmung der Leukozyten herangezogen (siehe 3.2.8), anschließend 10 min lang bei 2900 UPM bei Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C) und bei -20 °C für weitere Untersuchungen eingefroren. Anschließend wurde ein neuer Katheter eingeführt und mit Gewebekleber (Histoacryl) fixiert. Nun wurde die entnommene Menge an Liquor durch die Gabe von PBS ersetzt und anschließend mittels eines Druckwandlers über

einen in der *Cisterna magna* liegenden Katheter über 90 Sekunden hinweg der intrakranielle Druck gemessen.

Im nächsten Schritt wurde die Maus tief narkotisiert; anschließend wurde der Brustkorb eröffnet und mit einer zuvor mit Heparin (Heparin-Natrium 25000 I.E.) benetzten Spritze aus dem rechten Ventrikel des Mäuseherzens Blut entnommen. Ein Teil des Blutes wurde zur Bluttitrier-Bestimmung verwendet (siehe 3.2.9). Der Rest wurde zentrifugiert und das gewonnene Serum bei -20 °C eingefroren. Nun wurde das Gefäßsystems transkardial mit 15 ml eiskühlter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, die 10 U/ml Heparin enthielt, perfundiert. Nach der Perfusion wurde der Kopf abgetrennt, das Schädeldach eröffnet und die *Dura mater* entfernt. Das Gehirn wurde von der Schädelbasis getrennt und schonend entnommen. Kleinhirn und Hirnstamm wurden abgetrennt, die Großhirnoberfläche wurde auf Anzahl der Einblutungen und Qualität der Perfusion beurteilt, anschließend in ein Plastikschälchen gelegt und sofort bei -80 °C tiefgefroren. Das Kleinhirn wurde in 1 ml steriler PBS homogenisiert und zur Bestimmung der bakteriellen Titer verwendet (siehe Punkt 3.2.9).

3.2.7 Versuchsgruppen

In dieser Promotionsarbeit wurden verschiedene Versuchsserien zur Charakterisierung der Rolle von HMGB1 in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis durchgeführt.

3.2.7.1 Effekt von HMGB1-Antagonisten auf die Entwicklung einer Meningitis

Die Versuchsdauer der ersten Versuchsreihe betrug 24 Stunden. Die Mäuse der Versuchsgruppen 2-5 wurden durch eine intrazisternale Applikation von 20 µl 10⁷ KBE/ml *Streptococcus pneumoniae* infiziert; unmittelbar im Anschluss daran erfolgte die unten beschriebene Therapie.

Gruppe 1: Kontroll-Mäuse (sogenannte Negativkontrollen), n = 5; unbehandelte C57BL/6-Mäuse, denen anstelle der Pneumokokken 20 µl PBS intrazisternal injiziert wurde.

Gruppe 2: Infizierte Wildtyp-Tiere, n = 10; C57BL/6-Mäuse, denen 50 mg/kg Körpergewicht Ringer-Ethylpyruvat-Lösung (REPS, 0.5 ml) intraperitoneal verabreicht wurde.

- Gruppe 3:** Infizierte Wildtyp-Tiere, sogenannte Positivkontrollen zur Versuchsgruppe 2, n = 9; C57BL/6-Mäuse, denen eine Ringerlaktat-Lösung (RLS, 0.5 ml), das Vehikel der Ringer-Ethylpyruvat-Lösung, verabreicht wurde.
- Gruppe 4:** Infizierte Wildtyp-Tiere, n = 6; C57BL/6-Mäuse, denen 400 µg/Maus rekombinantes Box A Protein (0.4 ml) intraperitoneal verabreicht wurde.
- Gruppe 5:** Infizierte Wildtyp-Tiere, Positivkontrollen zur Versuchsgruppe 4, n = 6; C57BL/6-Mäuse, denen das Vehikel des rekombinanten Box A Proteins (Hepes-Natrium, NaCl, 4,4'-DDT) verabreicht wurde.

3.2.7.2 Effekt von HMGB1-Antagonisten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium

Die Versuchsdauer dieser Versuchsreihe betrug 45 Stunden. Die Mäuse der Versuchsgruppen 7-10 wurden zu Versuchsbeginn durch die intrazisternale Gabe von 20 µl 10^7 KBE/ml *Streptococcus pneumoniae* infiziert. Bei allen Mäusen dieser Versuchsreihe erfolgte 21 Stunden nach der intrazisternalen Injektion die antibiotische Therapie mit Ceftriaxon (100 mg/kg Körpergewicht).

- Gruppe 6:** Kontroll-Mäuse (sogenannte Negativkontrollen), n = 4: unbehandelte C57BL/6-Mäuse, denen anstelle der Pneumokokken 20 µl PBS intrazisternal injiziert wurde.
- Gruppe 7:** Infizierte Wildtyp-Tiere, n = 9; C57BL/6-Mäuse, die simultan mit der antibiotischen Therapie adjuvant mit 50 mg/kg Körpergewicht Ringer-Ethylpyruvat-Lösung (REPS, 0.5 ml) intraperitoneal behandelt wurden.
- Gruppe 8:** Infizierte Wildtyp-Mäuse, Positivkontrollen zur Versuchsgruppe 7, n = 9; C57BL/6-Mäuse, die anstelle von REPS eine Ringerlaktat-Lösung (RLS, 0.5 ml), das REPS-Vehikel, erhielten.
- Gruppe 9:** Infizierte Wildtyp-Tiere, n = 8; C57BL/6-Mäuse, denen 21 Stunden nach Infektion als adjuvante Therapiemaßnahme 400 µg/Maus an rekombinantem Box A Protein (0.4 ml) intraperitoneal verabreicht wurde.
- Gruppe 10:** Infizierte Wildtyp-Mäuse, Positivkontrollen zur Versuchsgruppe 9, n = 10; C57BL/6-Mäuse, denen das Vehikel des rekombinanten Box A Proteins simultan mit Ceftriaxon intraperitoneal appliziert wurde.

3.2.7.3 Einfluss von HMGB1 auf die Apoptose neutrophiler Granulozyten

Die Versuchstiere dieser Versuchsserie wurden durch eine intrazisternale Injektion von 20 µl 10⁷ KBE/ml *Streptococcus pneumoniae* infiziert und 18 Stunden später je nach Gruppenzugehörigkeit behandelt. Weitere 6 Stunden später (24 Stunden nach Infektion) wurde Liquor gewonnen, die Zellzahl und die Anzahl apoptotischer Zellen bestimmt (siehe Punkt 3.2.12). Dabei wurden folgende Versuchsgruppen untersucht:

- Gruppe 11:** Infizierte C57BL/6-Mäuse, n = 5, die eine Kombinationstherapie bestehend aus Ceftriaxon und Ringer-Ethylpyruvat-Lösung (50 mg/kg Körpergewicht) erhielten.
- Gruppe 12:** Infizierte C57BL/6-Mäuse, n = 5, die simultan mit Ceftriaxon und Ringerlaktat-Lösung behandelt wurden.

3.2.7.4 Untersuchungen zur Rolle von RAGE

Alle Mäuse dieser Versuchsreihe wurden mit 20 µl 10⁷ KBE/ml *Streptococcus pneumoniae* infiziert.

- Gruppe 13:** RAGE-defiziente Mäuse (RAGE^{-/-}, n = 7), die 24 Stunden nach Infektion evaluiert wurden.
- Gruppe 14:** C57BL/6-Mäuse (sogenannte Positivkontrollen; n = 7), die 24 Stunden nach Infektion untersucht wurden.
- Gruppe 15:** RAGE-defiziente Mäuse (RAGE^{-/-}, n = 7), die 21 Stunden nach Infektion antibiotisch mit Ceftriaxon behandelt und 24 Stunden später (45 Stunden nach Infektion) evaluiert wurden.
- Gruppe 16:** C57BL/6-Mäuse (n = 7), die 21 Stunden nach Infektion antibiotisch mit Ceftriaxon therapiert und 24 Stunden später analysiert wurden.
- Gruppe 17:** RAGE-defiziente Mäuse (n = 6), die 21 Stunden nach Infektion mit Ceftriaxon plus REPS (50 mg/kg Körpergewicht) behandelt und 24 Stunden später untersucht wurden.
- Gruppe 18:** RAGE-defiziente Mäuse (RAGE^{-/-}, n = 6), die 21 Stunden nach Infektion mit Ceftriaxon sowie RLS behandelt und 24 Stunden später evaluiert wurden.

3.2.7.5 Chemotaktischer Effekt von HMGB1

In dieser Versuchsserie wurde der Frage nachgegangen, ob HMGB1 *per se* die Migration von Leukozyten in den Liquor bewirken kann. Hierfür wurde 6 Stunden nach Versuchsbeginn Liquor gewonnen und die Leukozytenzahlen im Liquor bestimmt (siehe Punkt 3.2.8). Den Mäusen der Versuchsgruppen 19-21 wurde dazu zu Versuchsbeginn 5 µg rekombinantes HMGB1 (rHMGB1; gelöst in 20 µl steriler PBS) in die *Cisterna magna* injiziert.

Gruppe 19: C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (n = 7).

Gruppe 20: RAGE-defiziente Mäuse (RAGE^{-/-}, n = 4).

Gruppe 21: TLR2-TLR4-doppel-defiziente Mäuse (TLR2/4^{-/-}, n = 4)

Gruppe 22: C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (Kontrolltiere, n = 4), denen 20 µl PBS intrazisternal injiziert wurde.

Gruppe 23: C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (n = 4), denen 5 µg Hitze-inaktiviertes rekombinantes HMGB1 (HI-HMGB1; 1 Stunde bei 80 °C inaktiviert) intrazisternal verabreicht wurde.

Gruppe 24: C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (n = 4), die intrazisternal mit 25 µg an neutralisierendem anti-HMGB1-Antikörper (Anti-HMGB1 IgY vom Huhn, neutralisierender polyklonaler Antikörper; gelöst in 25 µl steriler PBS) vorbehandelt wurden und 1 Stunde später 5 µg rHMGB1 in die *Cisterna magna* injiziert bekamen.

Die Dosierung des intrazisternal verabreichten rHMGB1 orientierte sich an bei Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis beobachteten HMGB1-Konzentrationen (siehe Punkt 4.1).

3.2.8 Bestimmung der Leukozytenzahl im Liquor

Zur Bestimmung der Zellzahl im Liquor wurde eine Fuchs-Rosenthal-Kammer genutzt. Dabei wurden 2 µl Liquor zu 18 µl Türk'scher Lösung gegeben. Mit dieser Suspension wurde die Zählkammer gefüllt und die Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop (Nikon TMS) bei 40-facher Vergrößerung gezählt und deren Anzahl nach folgender Formel berechnet:

Material und Methoden

$$X = \frac{N * VF}{T}, \text{ wobei:}$$

1. $x = \text{Leukozytenzahl}/\mu\text{l}$
2. $N = \text{gezählte Leukozytenzahl in einem Großquadrat}$
3. $VF = \text{Verdünnungsfaktor; hier 10 bei 1:10 Verdünnung}$
4. $T = \text{Kammertiefe } 0,2 \text{ mm}$

3.2.9 Bestimmung der Bakterientiter im Maushirn-Homogenat und in Blutproben

Zur Bestimmung der bakteriellen Titer wurde das Kleinhirn vom Mäusehirn abgetrennt und in einem Greiner-Röhrchen in 1 ml steriler PBS mit einer Hochleistungsdispergiermaschine homogenisiert. Die Homogenate wurden in steriler PBS seriell verdünnt, auf Blutagarplatten (BD Columbia Agar mit 5 % Schafsblut) ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung bebrütet. Ebenso wurde aus dem rechten Herzventrikel entnommenes Blut mit steriler PBS seriell verdünnt, auf Blutagarplatten ausgestrichen und 24 Stunden bebrütet. Im Anschluss erfolgte die Auszählung der gewachsenen Pneumokokken-Kolonien, sowie die Berechnung der Bakterientiter unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen.

3.2.10 Herstellung von Hirnschnitten und Quantifizierung von Blutungszahl und -fläche

In einem Kryostaten wurden bei einer Kammertemperatur von –20 °C koronare Gefrierschnitte der Mäusehirne angefertigt. Dabei wurden die gefrorenen Mäusehirne so auf dem vorgekühlten Schneideblock befestigt, dass die Hirnbasis auf der von der Klinge abgewandten Seite lag. Durch diese Positionierung wurden die besten Ergebnisse hinsichtlich der Erhaltung des an der Hirnoberseite gelegenen Leptomeningealraumes, dem histopathologisch essentiellen Entzündungsort, erzielt. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte aus verschiedenen Hirnregionen, beginnend an den anterioren Anteilen der Seitenventrikel, gewonnen. Für Western Blot-Analysen wurden insgesamt drei Gefrierschnitte zu je 30 µm Dicke aus der Region *Bregma* hergestellt, die u.a. den Hippocampus und die Seitenventrikel enthielten, und jeder einzelne in einem Reaktionsgefäß aufbewahrt. Für die ELISA-Untersuchungen wurden Hirnschnitte von 30 und/oder 50 µm Dicke aus allen Hirnregionen in zwei Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt (1 x insgesamt 3180 µm Hirngewebe und 1 x 1050 µm Hirngewebe; letzteres diente als Reservegefäß). Alle Hirnschnitte wurden anschließend bei –80 °C aufbewahrt.

Sobald bei der Anfertigung der Hirnschnitte die Seitenventrikel sichtbar wurden, wurden seriell Photographien im Abstand von jeweils 300 µm angefertigt (insgesamt 9 Hirnschnitte pro

Material und Methoden

Mäusehirn) und digital prozessiert (Abbildung 9). Mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware *Image Tool 3.00* (UTHSCSA, San Antonio, USA) wurden die Photographien ausgewertet. Zentrale Messparameter waren die Anzahl der Blutungen und die Blutungsfläche. Zur anschaulichen graphischen Demonstration erfolgte eine weitere Bearbeitung der Photographien mit dem Graphik-Programm *Corel Photo-Paint® 11* (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada).

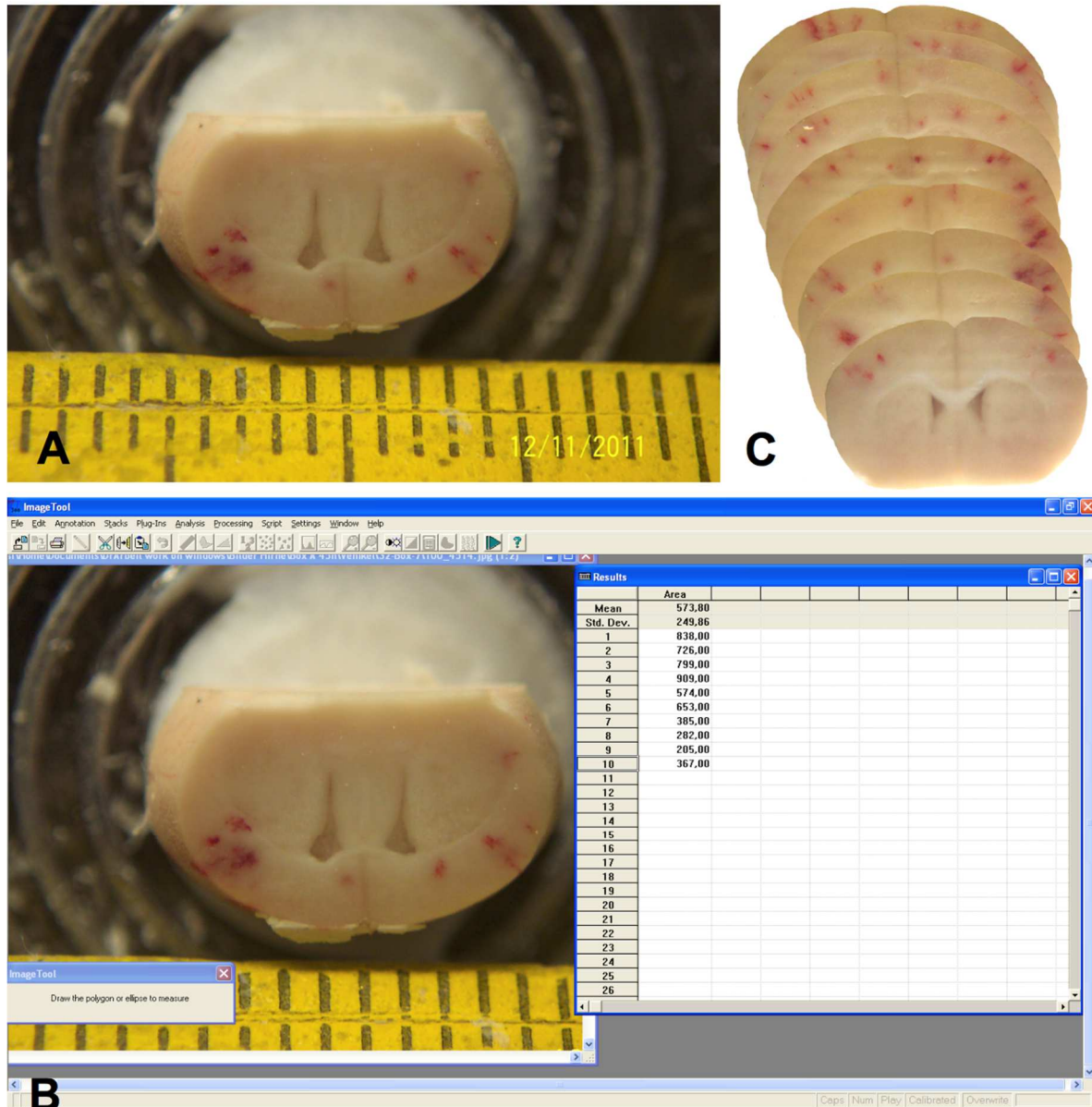


Abbildung 9: Digitalisierung und Bildverarbeitung der Hirnschnitte (exemplarische Darstellung)

[A] In einem Kryostaten wurden Hirnschnitte angefertigt. Sobald die Seitenventrikel sichtbar wurden, wurden digitale Photographien der Hirnschnitte im Abstand von jeweils 300 µm erstellt. [B] Die digitalen Bilder wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware *Image Tool 3.00* von UTHSCSA (San Antonio, USA) hinsichtlich

Blutungszahl und -fläche analysiert. [C] Die einzelnen Photographien wurden mit *Corel Photo-Paint® 11* (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada) zur anschaulichen Demonstration bearbeitet.

3.2.11 Immunhistochemischer Nachweis von RAGE und HMGB1

Zehn µm-dicke koronare Hirnschnitte, die die lateralen Ventrikel und den Hippocampus einschlossen, wurden mit einem polyklonalen Ziege-anti-Maus Antikörper, der gegen Maus-RAGE gerichtet ist, oder mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Maus Antikörper, der HMGB1 erkennt, gefärbt. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität mit einer 0.3 %-igen Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Lösung (in Methanol) und Absättigung unpezifischer Bindungsstellen durch 10 %-iges Kaninchenserum wurden die Hirnschnitte mit anti-RAGE- (in einer Verdünnung von 1:200) oder mit anti-HMGB1 Antikörpern (in einer Verdünnung von 1:500) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (PBS, jeweils 5 min) wurde biotinyliertes Kaninchen-anti-Ziege IgG oder Ziege-anti-Kaninchen IgG (in einer Verdünnung von 1:200) auf die Hirnschnitte gegeben, 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert und dadurch die primären Antikörper gegen RAGE bzw. HMGB1 durch sekundäre biotinylierte Antikörper gebunden. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die gebundenen sekundären Antikörper durch Inkubation mit einer an Streptavidin gebundener Meerrettichperoxidase und 3,3-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen visualisiert: Streptavidin ist ein Protein, das aus 4 identischen Untereinheiten aufgebaut ist; jede Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Biotin. Streptavidin bindet an das an die sekundären Antikörper gekoppelte Biotin. Die Meerrettichperoxidase oxidiert DAB und bildet so ein unlösliches Präzipitat brauner Farbe. Nach Gegenfärbung mit Mayer's Hämotoxylin-Lösung und Einbettung mit Kaiser's Glyceringelatine wurden die Gewebeschnitte mit einem Olympus BX51 Mikroskop untersucht und Bilder mit einer gekühlten, an einen Computer angeschlossenen *Moticam 5000* Videokamera und dem zugehörigen Computerprogramm *Motic Image Plus 2.0* aufgenommen.

3.2.12 Bestimmung der Zahl apoptotischer Zellen im Liquor

Zur Bestimmung der Zahl apoptotischer Zellen wurden in den Versuchsgruppen 11 und 12 (siehe 3.2.7.3) Ausstrichpräparate von Liquorproben angefertigt. Dabei wurde ein Tropfen Liquor auf einen Objektträger aufgebracht und gleichmäßig mit Hilfe eines Deckglases ausgestrichen. Nachdem der Ausstrich getrocknet war, wurde eine Schnellfärbung mit der

Hemacolor® Schnellfärbung von Blutaussstrichen durchgeführt. Anschließend wurden 200 Zellen mikroskopisch betrachtet, die Subpopulationen der Leukozyten beurteilt und anhand der morphologischen Kriterien Karyopyknose (Schrumpfung des Zellkerns und Verdichtung des Chromatins) und Karyorrhexis (destruktive Kernfragmentierung) die Anzahl apoptotischer Zellen im Liquor bestimmt.

3.3 Messungen der Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α , TGF- β , CXCL1 und CXCL2 im Gehirn

Die Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α , transformierendem Wachstumsfaktor beta (TGF- β ; *transforming growth factor beta*), Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 1 (CXCL1) und CXCL2 im Gehirn von Mäusen wurden mittels ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt.

TNF- α , IL-1 β und IL-6 werden als wichtige Entzündungsmediatoren der frühen Phase der Pneumokokkenmeningitis betrachtet (Barichello, T. et al., 2012; Koedel, U. et al., 2002a; Mook-Kanamori, B. B. et al., 2011; Ramesh, G. et al., 2013). In Liquorproben von Patienten mit akuter bakterieller Meningitis konnten erhöhte Konzentrationen dieser Zytokine gemessen werden; dabei korrelierte die Konzentration von IL-1 β mit einem ungünstigen Krankheitsausgang und mit der Krankheitsschwere (Tauber, M. G. und Moser, B., 1999; van Furth, A. M. et al., 1996). Insbesondere IL-1 β und TNF- α stimulieren die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die die Passage von Leukozyten in den Subarachnoidalraum erleichtern (Dinarello, C. A., 2000). TGF- β ist ein anti-inflammatorisches Zytokin. Es inhibiert u.a. die Aktivierung von Makrophagen und die Produktion zahlreicher proinflammatorischer Zytokine von Mikrogliazellen, wie IL-1 β , IL-6 und TNF (Ledeboer, A. et al., 2000; Mook-Kanamori, B. B. et al., 2011; Suzumura, A. et al., 1993).

Chemokine sind eine Subgruppe von Zytokinen mit chemotaktischer Aktivität, sie rekrutieren Effektor-Immunzellen zur Infektionsstelle (Janeway, C., eds. , 2005). Im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis waren die *messenger-RNA* (mRNA) und die Protein-Expression der Chemokine MIP-2 (CXCL2) und KC (Keratinozyten-abgeleitetes Zytokin; CXCL1), die auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirken, im Akutstadium der Erkrankung im Gehirn deutlich erhöht (Koedel, U. et al., 2001; Koedel, U. et al., 2002a; Winkler, F. et al., 2001). Die

Neutralisation der Chemokine resultiert in einer erheblichen Reduktion der Liquorpleozytose (Woehrl, B. et al., 2011).

3.4 Western Blot-Analysen von HMGB1

Die HMGB1-Freisetzung wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen in [i] Liquorproben von 4 erwachsenen Patienten mit kulturell nachgewiesener Pneumokokkenmeningitis und 4 bezüglich Alter und Geschlecht übereinstimmenden Patienten mit nicht-inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (2 mit Migräne, 2 mit idiopathischer Fazialisparese), [ii] Liquorproben von Mäusen verschiedener Versuchsgruppen und [iii] Überständen der Zellkultur-Experimente untersucht. Bei allen Patienten erfolgte die Lumbalpunktion zu diagnostischen Zwecken nach Einverständniserklärung. Die Verwendung der Liquorproben wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

Um HMGB1 in den Zellkultur-Überständen zu konzentrieren, wurden 15 µl des Harzes StrataClean Resin zu 200 µl Zellkultur-Überstand hinzugefügt. Die Harz-gebundenen Proteine wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 13000 UPM rückgewonnen, mit PBS gewaschen und erneut 15 Minuten bei 13000 UPM zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 µl PBS neu aufgelöst. Diese Proteinlösung bzw. 10 µl menschlicher Liquor wurden 1:1, 3 µl Mäuse-Liquor wurden 1:6 in Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, 4 % SDS [= Natriumlaurylsulfat], 0.05 % Bromphenolblau, 20 % Glycerol und 5 % β -Mercaptoethanol) verdünnt und für 10 min auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proteingemische in die Taschen der Kassette des Gels (4-12 % NuPAGE® Novex® Tris-Bis Gel; Novex® NP 0322) übertragen und mittels Elektrophorese (Spannung $U = 200$ V; Stromstärke I bei Start = 110-125 mA, I bei Ende = 70-80 mA) innerhalb von 35 min in einem Laufpuffer (50 ml NuPAGE® Novex® MES SDS Laufpuffer [Novex® NP 0002] + 950 ml Aqua dest.) aufgetrennt. Im nächsten Schritt erfolgte das Blotting: Die Plastikkassette wurde vorsichtig geöffnet, das Gel entnommen und im Sandwich-Verfahren in das Blot-Modul eingelegt. Die Proteine wurden 60 min lang bei 30 V und 170 mA (Start) bzw. 110 mA (Ende) in einem Transferpuffer (50 mL NuPAGE® Novex® Transferpuffer [Novex® NP 0006] + 100 ml Methanol + 850 ml Aqua dest.) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) transferiert und diese anschließend 1 Stunde bei 37 °C getrocknet. Zur Kontrolle der Elektrophorese bzw. des elektrophoretischen Transfers auf die Membran wurde als Marker *BenchMark™* von *Life Technologies* verwendet.

Die Membranen wurden für 18 Stunden bei 4 °C mit einem polyklonalen anti-HMGB1 Antikörper vom Kaninchen (verdünnt 1:1000 mit PBS-Tween und 0.5 % Milchpulver) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (PBS-Tween, jeweils 5 min) wurden im nächsten Schritt sekundäre Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Kaninchen-IgG (1:2000 mit PBS-Tween und 0.5 % Milchpulver verdünnt) zugefügt. Auf diese Weise wurden nach einer 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen (PBS-Tween, zweimal je 5 min) die primären gebundenen Antikörper mittels „*FemtoMax Super Sensitive Chemiluminescent Substrat Kit*“ von *Rockland Immunochemicals* detektiert. Die Blots wurden durch ein Bildanalysesystem mit einer CCD-Kamera (ChemiDoc-IT® Imaging System) visualisiert und digitalisiert.

3.5 Statistische Methoden

Die Daten wurden mit dem statistischen Programm *Systat 9.0* (Systat Software, Inc., Chicago, USA) ausgewertet. Als zentrales statistisches Testverfahren (bei Vergleich von mehr als zwei Versuchsgruppen) wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (*ANOVA*), gefolgt vom *Bonferroni post hoc Test*, verwendet. Beim Vergleich von zwei Gruppen kam der ungepaarte *Student's t-Test* zur Anwendung. Die Auswertung erfolgte entsprechend den Vorgaben und Empfehlungen von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mansmann vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE).

Unterschiede wurden bei $P < 0.05$ als signifikant betrachtet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 HMGB1-Freisetzung in den Liquor während einer Pneumokokkenmeningitis

Aktuelle Studien berichteten von erhöhten HMGB1-Konzentrationen in Liquorproben von Kindern mit einer bakteriellen Meningitis (Asano, T. et al., 2011; Tang, D. et al., 2008). Im Einklang damit detektierten wir mittels Western Blot-Analysen große Mengen an HMGB1 (mit Konzentrationen über 2 µg/ml) im Liquor von vier erwachsenen Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis (Abbildung 10A). Auch im Liquor von Mäusen mit einer Pneumokokkenmeningitis ließ sich extrazelluläres HMGB1 nachweisen, nicht aber bei nicht-infizierten Kontrolltieren (Abbildung 10B). Dabei war die Immunreaktivität von HMGB1 im Western Blot in Liquorproben, die 45 Stunden nach Infektion der Mäuse gewonnen worden waren, größer als in Proben, die bereits 24 Stunden nach Infektion abgenommen worden waren. Dies weist auf eine mögliche Rolle von HMGB1 in fortgeschritteneren Stadien der Krankheit (und nicht in der Frühphase der Erkrankung) hin.

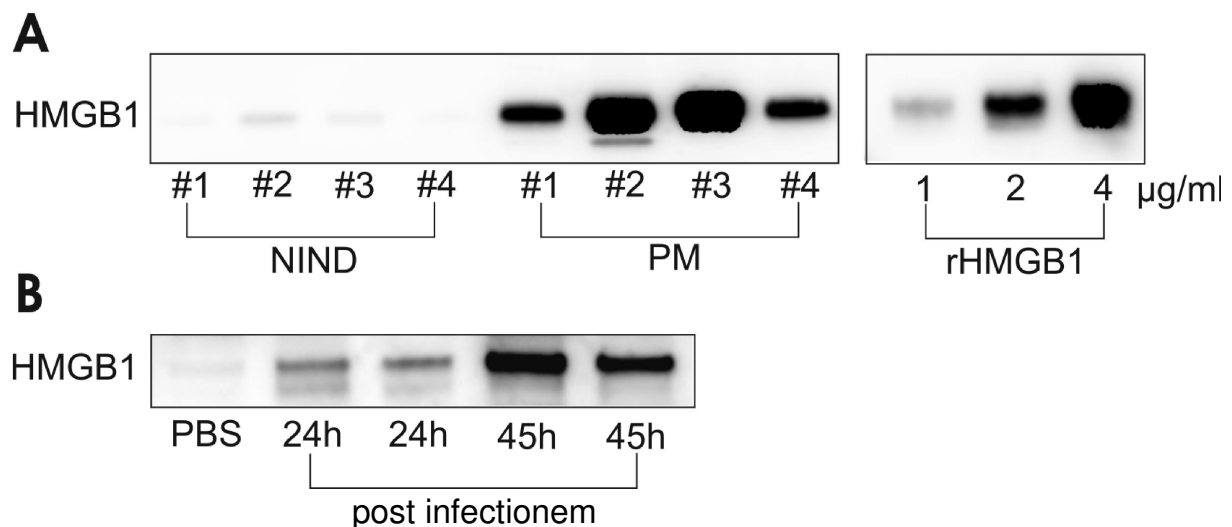


Abbildung 10: HMGB1-Freisetzung in den Liquor während einer Pneumokokkenmeningitis

HMGB1 wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt. **[A]** Liquor von Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis (PM; n = 4) und nicht-inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (NIND; n = 4). Als Positivkontrolle wurden bekannte Konzentrationen an rekombinantem HMGB1 (rHMGB1) eingesetzt. **[B]** Im Mausmodell wurden Liquorproben 24 oder 45 Stunden nach intrazisternaler Infektion mit *S. pneumoniae* gewonnen. Kontrollliquor stammte von Mäusen, denen anstelle von Pneumokokken intrazisternal PBS appliziert worden war.

4.2 Effekt der HMGB1-Antagonisierung bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Um die Funktion von HMGB1 in der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis zu charakterisieren, wurden infizierte Mäuse mit den HMGB1-Antagonisten Ethylpyruvat (REPS, Ringer-Ethylpyruvat-Lösung) oder rekombinantem Box A Protein behandelt. Um dabei die Funktion von HMGB1 sowohl bei der Entwicklung als auch bei der Persistenz der meningealen Entzündungsreaktion zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Modelle eingesetzt (siehe unten). HMGB1-defiziente Mäuse sind aufgrund von Störungen im Glucose-Metabolismus und pleiotroper Defekte nicht lebensfähig (Calogero, S. et al., 1999). Rekombinantes Box A Protein kann mit funktionellem HMGB1 um Bindestellen auf der Zelloberfläche konkurrieren und wirkt so als kompetitiver Antagonist von extrazellulärem HMGB1 (Gong, Q. et al., 2009; Sitia, G. et al., 2007; Yang, H. et al., 2004). REPS, ein stabiles lipophiles Derivat von Pyruvat, hemmt die Freisetzung von HMGB1 (Ulloa, L. et al., 2002). Dieser Effekt konnte im Liquor von Mäusen nach der Induktion einer Pneumokokkenmeningitis bestätigt werden: Nach intraperitonealer Applikation von REPS ließ sich im Liquor nahezu kein HMGB1 mehr nachweisen (Abbildung 11).

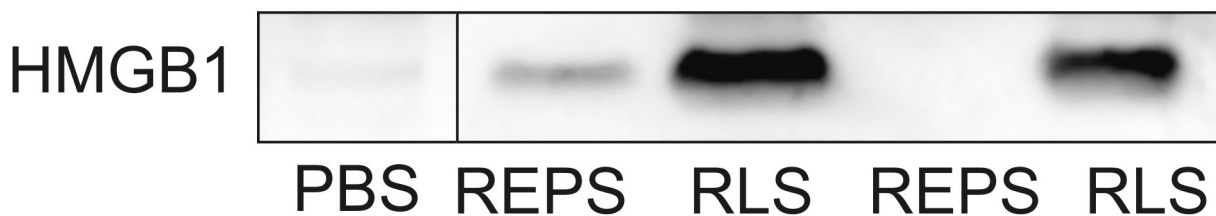


Abbildung 11: Ethylpyruvat hemmt die HMGB1-Freisetzung in den Liquor

PBS = Liquor einer nicht-infizierten Kontroll-Maus, der Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung intrazisternal injiziert worden war. REPS = Liquorproben von Mäusen mit einer Pneumokokkenmeningitis, die mit Ringer-Ethylpyruvat-Lösung (50 mg/kg Körpergewicht) behandelt worden waren. RLS = Liquorproben von Mäusen mit einer Pneumokokkenmeningitis, die mit Ringerlaktat-Lösung, dem Vehikel von REPS, behandelt worden waren.

In einer ersten Versuchsserie, die auf die Charakterisierung der Funktion von HMGB1 bei der Entwicklung der Pneumokokkenmeningitis zielte, wurden C57BL6/n-Mäuse mit *S. pneumoniae* (D39-Stamm; 10^5 Kolonien-bildende Einheiten, KBE) intrazisternal infiziert und anschließend mit bekannten HMGB1-Hemmstoffen, nämlich Ethylpyruvat (REPS) oder rekombinantem Box A Protein (boxA), bzw. deren Trägersubstanzen (RLS, veh_{boxA})

Ergebnisse

behandelt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Mäuse klinisch und pathophysiologisch untersucht. Als Kontrollen dienten nicht-infizierte Mäuse, denen statt *S. pneumoniae* Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) intrazisternal appliziert wurde. Innerhalb von 24 Stunden nach Injektion der Pneumokokken entwickelten alle Mäuse, unabhängig vom Behandlungsregime, klinische Zeichen einer Infektion, die sich als signifikant erhöhte klinische Score-Werte im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollmäusen manifestierten (Abbildung 12).

Weder durch die Gabe von Ethylpyruvat noch durch die Applikation von Box A Protein konnte der Meningitis-induzierte Anstieg der Liquorleukozytenzahl (Abbildung 12A) sowie der Hirn-Konzentrationen wichtiger Entzündungsmediatoren, wie IL-1 β , TNF- α , CXCL1, CXCL2 (Abbildung 12B-E) und TGF- β (3.34 ± 0.34 pg/mg Protein bei RLS-behandelten Mäusen, im Vergleich zu 3.11 ± 0.85 pg/mg Protein bei REPS-behandelten Mäusen; 3.08 ± 0.89 pg/mg bei HEPES-NaCl-behandelten Mäusen, im Vergleich zu 3.79 ± 0.88 pg/mg bei Mäusen, die mit Box A behandelt worden waren) reduziert werden. Ferner wurde durch keine der beiden Behandlungsmaßnahmen die Entwicklung intrakranieller Komplikationen (wie der Anstieg des intrakraniellen Drucks [Abbildung 12F] und das Ausmaß der intrakraniellen Blutungen [Abbildung 12G und Abbildung 13]) sowie der klinische Verlauf [Abbildung 12H] beeinflusst. Darüber hinaus führte die Vorbehandlung mit rekombinantem Box A Protein oder mit REPS zu keinen Veränderungen der Pneumokokken-Titer im Gehirn und Blut (Abbildung 12I, K).

Ergebnisse

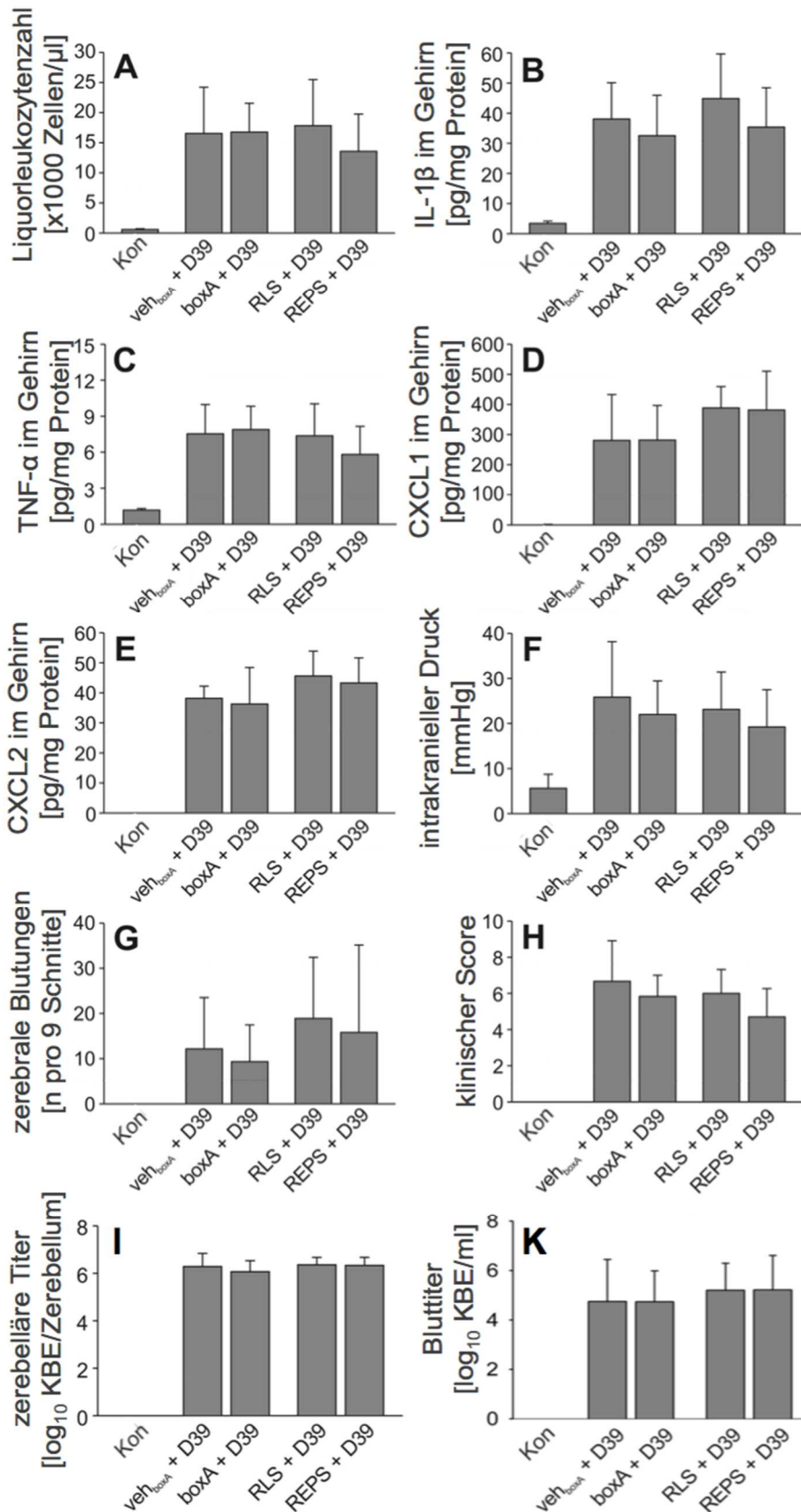


Abbildung 12: Funktion von HMGB1 bei der Entwicklung der meningealen Entzündungsreaktion

boxA = rekombinantes Box A Protein (400 μ g/Maus). D39 = *S. pneumoniae* Serotyp 2. KBE = Kolonienbildende Einheiten. Kon = Kontroll-Mäuse. REPS = Ringer-Ethylpyruvat-Lösung (50 mg/kg Körpergewicht).

Ergebnisse

RLS = Ringerlaktat-Lösung (Vehikel von REPS). Veh_{BoxA} = HEPES-NaCl (Vehikel von rekombinantem Box A Protein). Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar.

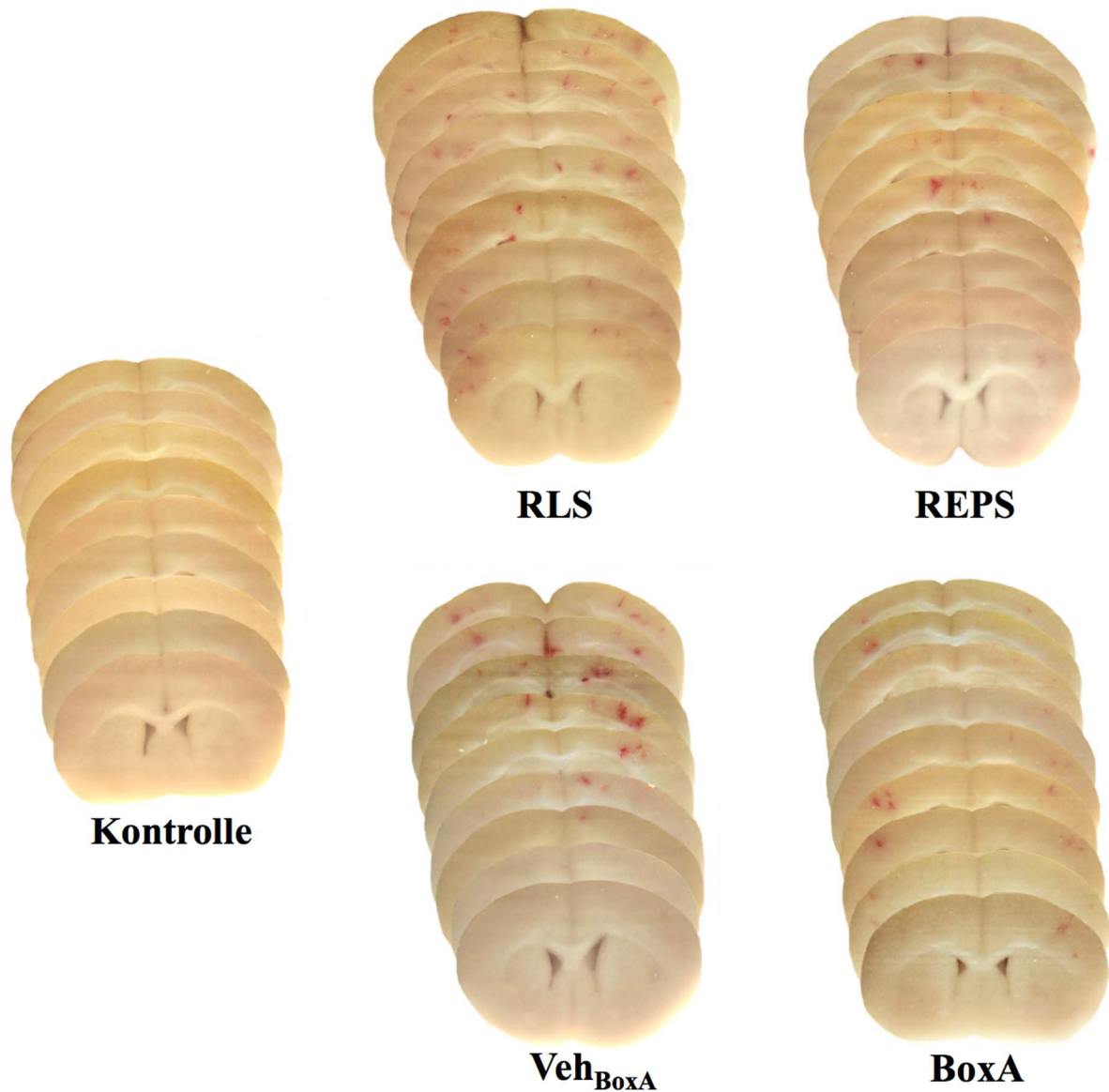


Abbildung 13: Repräsentative Bilder von Mäusehirnen, die von jeweils einer typischen Maus jeder Behandlungsgruppe angefertigt wurden.

Die Gehirnschnitte wurden mit einem Kryostaten angefertigt und mit einer Digitalkamera fotografiert. Das Ausmaß der intrakraniellen Blutungen war bei Mäusen, die zum Zeitpunkt der Infektion mit den HMGB1-Antagonisten Ethylpyruvat (REPS) bzw. rekombinantem Box A Protein (BoxA) behandelt worden waren, vergleichbar mit dem von Mäusen, die die entsprechenden Vehikelsubstanzen Ringerlaktat (RLS) bzw. HEPES-NaCl (Veh_{BoxA}), erhalten hatten. Kontrolltiere (Kontrolle), denen PBS intrazisternal injiziert worden war, zeigten niemals Einblutungen.

Ergebnisse

In einer weiteren Versuchsreihe testeten wir den Effekt dieser HMGB1-Hemmstoffe im fortgeschrittenen Stadium (kliniknahes Modell) der Erkrankung, d.h. die Mäuse wurden 21 Stunden nach der Infektion mit einer Kombination aus Antibiotikum und Ethylpyruvat bzw. Box A Protein behandelt. Um die Mäuse vor einer erheblichen Ausbreitung der Pathogene und dem damit einhergehenden Tod zu schützen, mussten sie in diesem Versuchsansatz antibiotisch behandelt werden. Die antibiotische Behandlung mit Ceftriaxon führt zu einer raschen Elimination der Bakterien aus dem Blut, Liquor oder Gehirn (Grandgirard, D. et al., 2010; Koedel, U. et al., 2009a).

Die zentralen Befunde dieser Experimente sind in Abbildung 14 dargestellt.

Die Behandlung mit rekombinantem Box A Protein und REPS beeinflusste die Bakterienelimination durch Ceftriaxon nicht (Abbildung 14I, K). Durch die adjuvante Behandlung mit den HMGB1-Antagonisten konnte jedoch die Liquorpleozytose im Vergleich zu Vehikel-behandelten infizierten Mäusen signifikant reduziert werden (Abbildung 14A). Die Reduktion der Liquorpleozytose ging dabei nicht mit einer Abnahme der Hirn-Konzentrationen an IL-1 β , TNF- α (Abbildung 14B, C), TGF- β (2.81 ± 0.79 pg/mg Protein bei RLS-behandelten Mäusen, im Vergleich zu 2.24 ± 1.04 pg/mg Protein bei REPS-behandelten Mäusen; 2.85 ± 0.83 pg/mg bei HEPES-NaCl-behandelten Mäusen, im Vergleich zu 2.36 ± 0.90 pg/mg bei Tieren, die mit Box A behandelt worden waren), CXCL1 und CXCL2 (Abbildung 14D, E) einher. Die genannten proinflammatorischen Mediatoren waren unter antibiotischer Therapie auf nahezu normale Werte abgefallen, unabhängig davon, ob die Mäuse mit HMGB1-Antagonisten behandelt worden waren oder nicht. Die Reduktion der Liquorleukozytenzahl wurde von einer signifikanten Verbesserung der Hirnpathologie begleitet: So waren bei mit HMGB1-Antagonisten behandelten Mäusen die intrakraniellen Druckwerte (Abbildung 14F) und die Anzahl der zerebralen Blutungen (Abbildung 14G) signifikant niedriger als bei den Mäusen der entsprechenden Vergleichsgruppe. Die Abschwächung der intrakraniellen Komplikationen war mit einem besseren klinischen Status der Tiere (Abbildung 14H) vergesellschaftet.

Kurz zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass HMGB1 entscheidend zur Persistenz des massiven Leukozyteninfiltrates beiträgt. Letzteres scheint wiederum zur Verstärkung der zerebralen Schäden während einer bakteriellen Meningitis zu führen.

Ergebnisse

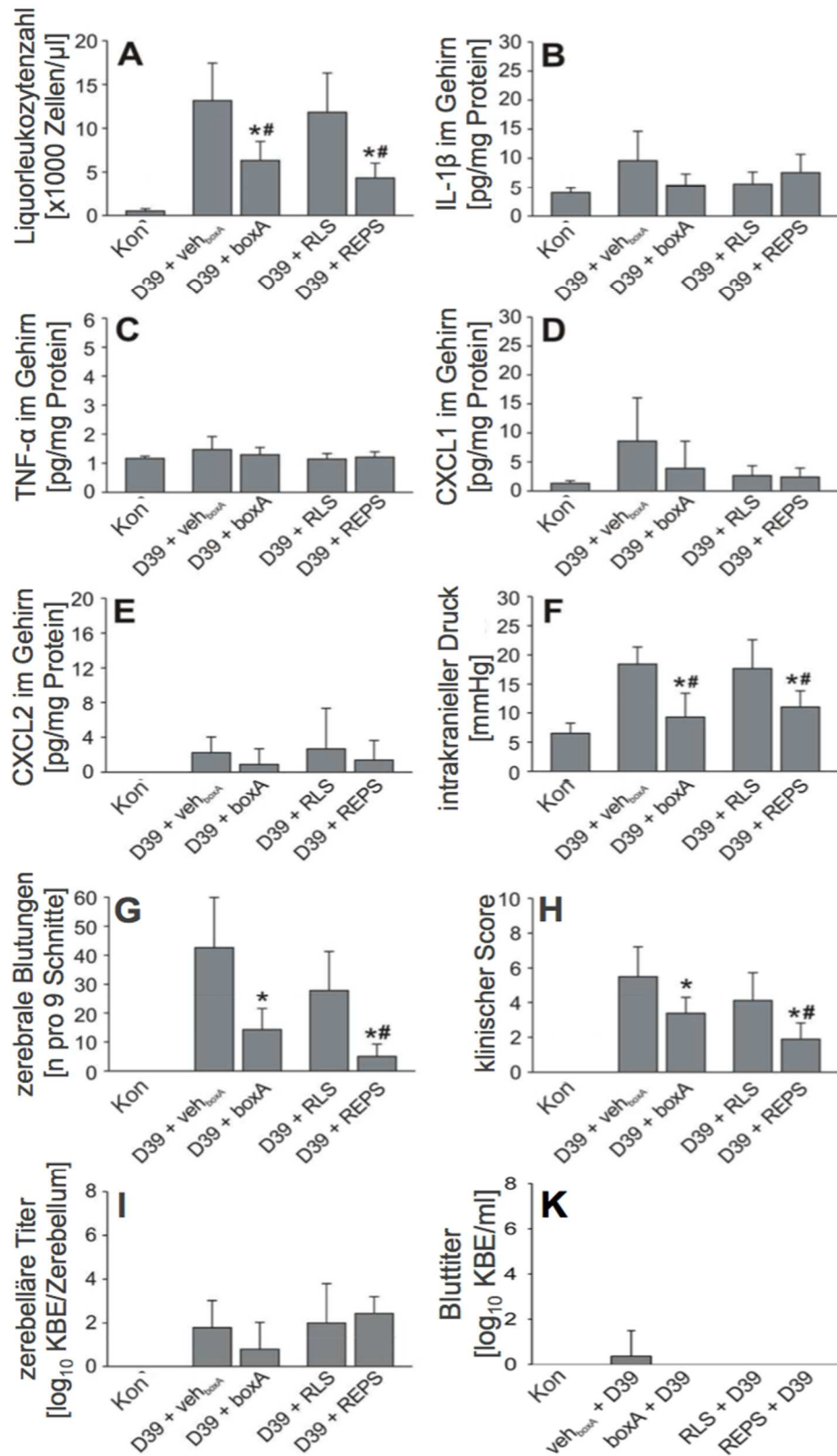


Abbildung 14: Funktion von HMGB1 bei der Persistenz der meningealen Entzündungsreaktion

Anmerkungen: boxA = rekombinantes Box A Protein (400 μ g/Maus). D39 = *S. pneumoniae* Serotyp 2. KBE = Kolonien-bildende Einheiten. Kon = Kontrolltiere. REPS = Ringer-Ethylpyruvat-Lösung (50 mg/kg Körpergewicht). RLS = Ringerlaktat-Lösung (Vehikel von REPS). veh_{boxA} = HEPES-NaCl (Vehikel von

Ergebnisse

rekombinantem Box A Protein). Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar. * $P < 0.05$, verglichen mit veh_{BoxA}-behandelten infizierten Mäusen mittels ANOVA und Bonferroni's Test für post hoc Analysen. # $P < 0.05$, verglichen mit RLS-behandelten infizierten Mäusen mittels ANOVA und Bonferroni's Test für post hoc Analysen.

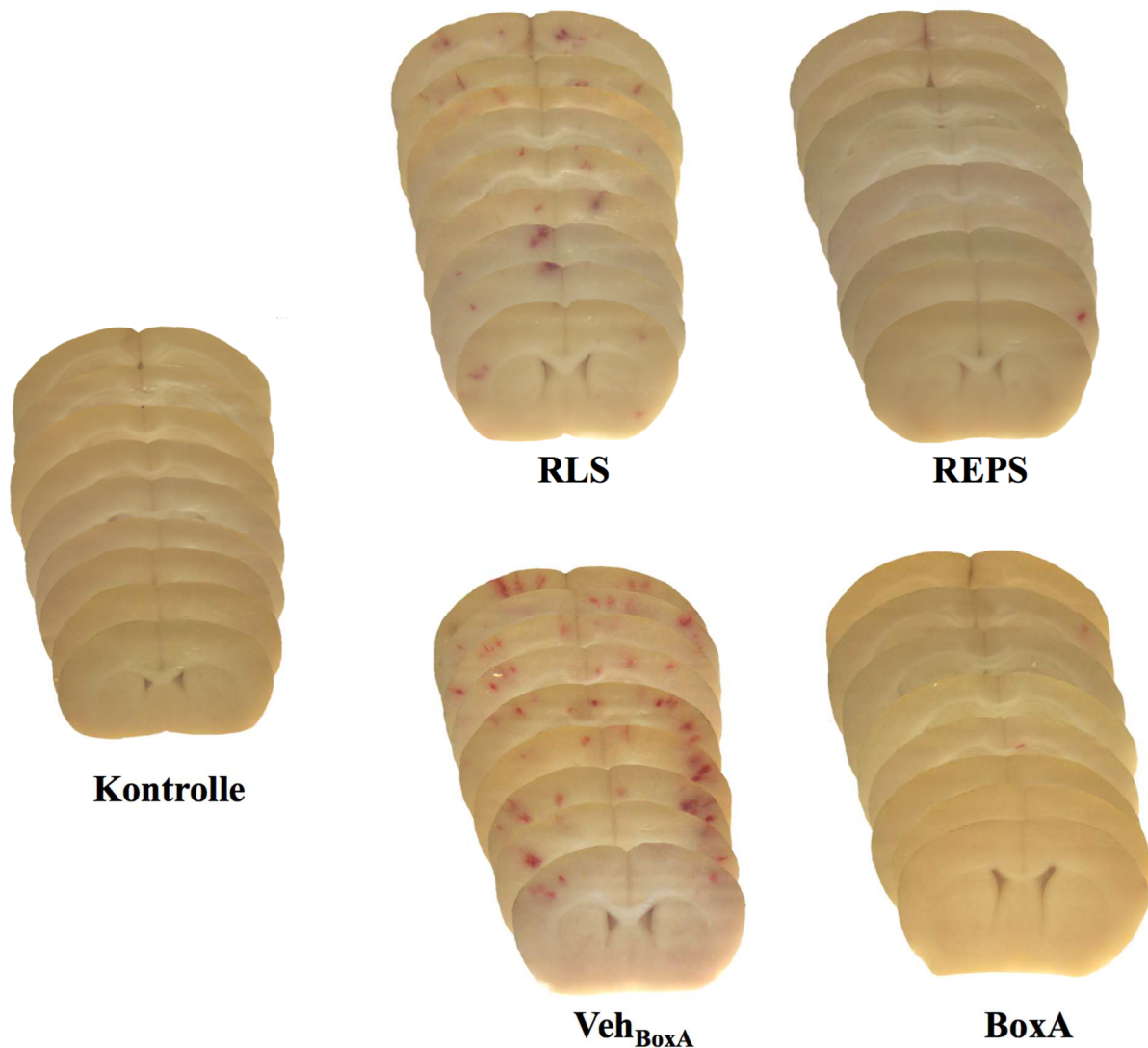


Abbildung 15: Repräsentative Aufnahmen von Gehirnen einzelner typischer Mäuse aus den verschiedenen Behandlungsgruppen

Die Gehirnschnitte wurden mit einem Kryostaten angefertigt und mit einer Digitalkamera fotografiert. Das Ausmaß der intrakraniellen Blutungen war bei Mäusen, die 21 Stunden nach intrazisternaler Infektion mit *S. pneumoniae* mit einer Kombination aus Ceftriaxon und den HMGB1-Antagonisten Ethylpyruvat (REPS) bzw. rekombinantem Box A Protein (BoxA) behandelt worden waren, deutlich geringer ausgeprägt im Vergleich zu Mäusen, die die entsprechenden Vehikelsubstanzen, Ringerlaktat (RLS) bzw. HEPES-NaCl (Veh_{BoxA}), erhalten hatten. Kontrolltiere (Kontrolle), denen PBS intrazisternal appliziert worden war, zeigten niemals Einblutungen.

4.3 Wirkmechanismus von HMGB1

Wie bereits im Abschnitt 1.3.7.1 beschrieben, kann HMGB1 über verschiedene Wirkmechanismen Entzündungsreaktionen beeinflussen. Kurz zusammengefasst, können proinflammatorische Effekte von HMGB1 auf [i] einer Induktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, [ii] einer Inhibition der Apoptose neutrophiler Granulozyten mit konsekutiver Hemmung der Phagozytose apoptotischer Neutrophiler und/oder [iii] einer direkten chemotaktischen Wirkung auf Neutrophile (und Monozyten) beruhen (Andersson, U. und Tracey, K. J., 2011).

4.3.1 Einfluss von HMGB1 auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine

Um einen möglichen Effekt von HMGB1 auf die Meningitis-assoziierte Produktion von Zytokinen und Chemokinen zu erfassen, untersuchten wir, ob durch die Gabe von HMGB1-Antagonisten die Produktion von IL-1 β , TNF- α , CXCL1 und CXCL2, die in der Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis eine Schlüsselrolle einnehmen (Hoegen, T. et al., 2011; Woehrl, B. et al., 2011; Zwijnenburg, P. J. et al., 2003) moduliert/beeinflusst wurde. Sowohl in der Akutphase der Erkrankung als auch im kliniknahen Behandlungsmodell fanden wir ähnliche (nicht signifikant unterschiedliche) Konzentrationen dieser Entzündungsfaktoren im Gehirn behandelter und unbehandelter Mäuse (Abbildung 12B-E und Abbildung 14B-E).

Diese Beobachtung spricht gegen die These, dass HMGB1 bei der Pneumokokkenmeningitis als proinflammatorischer, Zytokin-ähnlicher Faktor wirkt.

4.3.2 Einfluss von HMGB1 auf die Apoptose neutrophiler Granulozyten

Um die Hypothese zu überprüfen, ob der Persistenz der meningealen Entzündungsreaktion eine HMGB1-vermittelte Hemmung der Granulozyten-Apoptose zu Grunde liegt, analysierten wir die Zellzusammensetzung und -morphologie im Liquor infizierter Mäuse. Die Liquorproben wurden dabei 6 Stunden nach dem Beginn einer Kombinationstherapie gewonnen, die aus der gemeinsamen Gabe von Ceftriaxon und dem HMGB1-Antagonisten REPS bzw. dessen Vehikel RLS bestand.

Zum Untersuchungszeitpunkt war die Liquorleukozytenzahl bei den REPS-behandelten Tieren tendenziell geringer als bei RLS-behandelten Mäusen (14213 ± 1609 Zellen/ μ l versus 19113 ± 4792 Zellen/ μ l). Bei der Zelldifferenzierung stellten wir zwischen beiden

Behandlungsgruppen keine Unterschiede der prozentualen Verteilung der Leukozyten-Subpopulationen fest. Der Anteil apoptotischer Leukozyten war bei Mäusen, die mit Ceftriaxon und REPS behandelt worden waren, vergleichbar mit der entsprechenden Placebo-Vergleichsgruppe (8.0 ± 3.7 versus 9.3 ± 3.2 % von 200 ausgezählten Leukozyten). Folglich scheint die HMGB1-assoziierte Persistenz des leukozytären Infiltrats nicht durch eine Hemmung der Apoptose von Leukozyten bedingt zu sein.

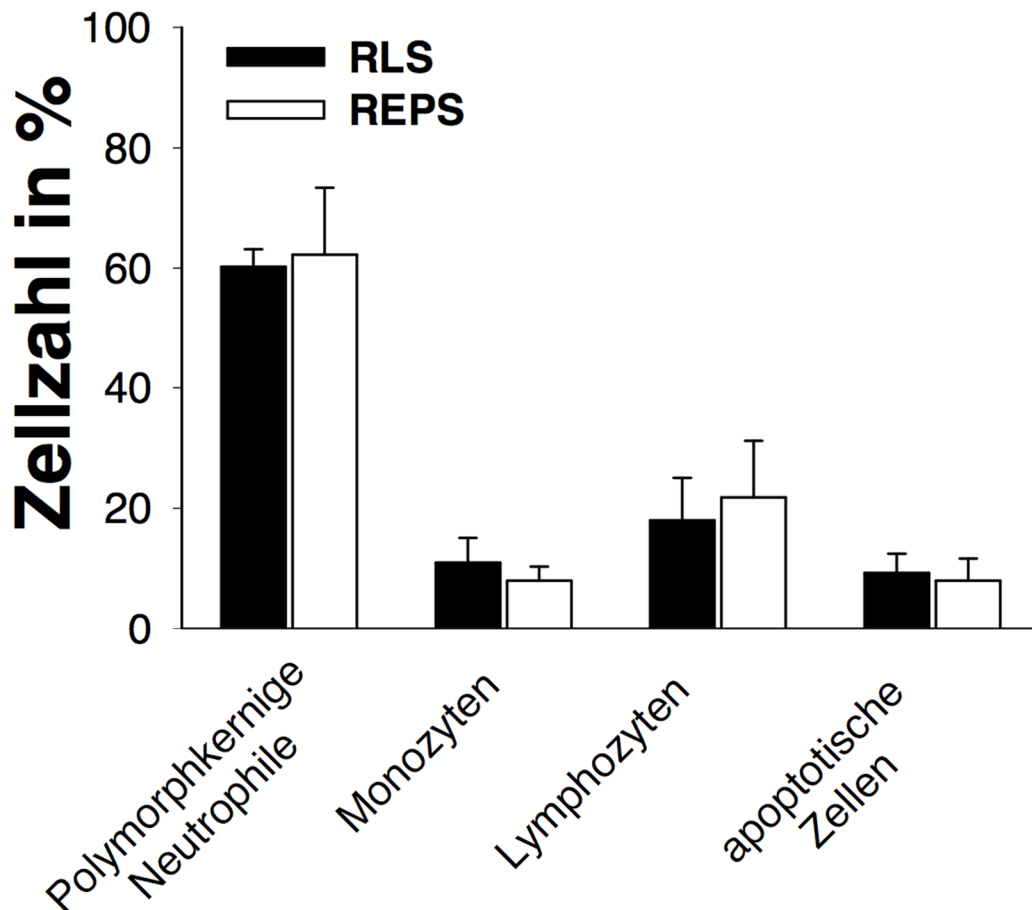


Abbildung 16: Relativer Anteil einzelner Leukozyten-Subpopulationen im Liquorausstrich

Die Zellzahl ist in Prozent von 200 ausgezählten Leukozyten dargestellt. Anmerkungen: REPS = Ringer-Ethylpyruvat-Lösung (50 mg/kg Körpergewicht). RLS = Ringerlaktat-Lösung (Vehikel von REPS). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben.

4.3.3 Chemotaktischer Effekt von HMGB1

Im nächsten Schritt wollten wir prüfen, ob die berichtete, direkte chemotaktische Wirkung von HMGB1 auf Neutrophile und Monozyten (Berthelot, F. et al., 2012; Orlova, V. V. et al.,

2007; Penzo, M. et al., 2010; Rouhiainen, A. et al., 2004) zur Aufrechterhaltung des meningealen Infiltrats bei der Pneumokokkenmeningitis beiträgt.

Zunächst untersuchten wir den Effekt von rekombinantem HMGB1 auf das Migrationsverhalten muriner Hoxb8-Neutrophiler in einem Mikrochemotaxie-Kammer-Assay. Rekombinantes murines CXCL2 diente als Positivkontrolle (Abbildung 17A). Bei diesen *in vitro*-Chemotaxie-Analysen beobachteten wir eine konzentrationsabhängige Wanderung der Hoxb8-Zellen in Richtung rHMGB1. Dabei war die chemotaktische Wirkung von 5 µg/ml rHMGB1 mit der von 5 ng/ml rCXCL2 vergleichbar. Durch Zugabe von funktionsblockierenden anti-HMGB1-Antikörpern konnte die HMGB1-induzierte Migration der Hoxb8-Zellen nahezu komplett verhindert werden. Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Vorbehandlung der Hoxb8-Neutrophilen mit einem RAGE-blockierenden Antikörper (19.3 ± 3.9 Zellen/Feld), (nicht aber mit dessen Isotyp-Kontroll-Antikörper [39.6 ± 5.7 Zellen/Feld]) erzielt werden.

Vergleichbare Befunde erhielten wir, wenn wir anstelle der Hoxb8-Zellen primäre Knochenmarks-Granulozyten von Wildtyp-Mäusen und RAGE-defizienten Mäusen bei den Migrationsversuchen verwendeten (Abbildung 17B): HMGB1 zeigte eine chemotaktische Wirkung auf Neutrophile aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen, nicht aber auf Neutrophile aus dem Knochenmark von RAGE-defizienten Mäusen.

Im nächsten Schritt sollte die Reproduzierbarkeit dieser Effekte von rHMGB1 *in vivo* geprüft werden. Dazu wurden 5 µg rHMGB1 durch eine transkutane, intrazisternale Punktion in den Liquor von Mäusen injiziert, 6 Stunden später Liquor gewonnen und darin die Leukozytenzahl bestimmt (Abbildung 17C). Die intrathekale Gabe von rHMGB1 führte zu einem signifikanten Anstieg der Liquorleukozytenzahlen im Vergleich zu sogenannten Negativkontrollen, denen entweder Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) oder Hitze-inaktiviertes HMGB1 (HI-HMGB1) intrazisternal appliziert worden waren. Analog zu den *in vitro* Ergebnissen konnte durch eine intrathekale Vorbehandlung mit anti-HMGB1-Antikörpern die HMGB1-induzierte Liquorpleozytose signifikant verringert werden.

Um einen Einblick in die Rezeptoren zu erhalten, die an der HMGB1-induzierten Rekrutierung von Leukozyten beteiligt sind, wurde im Folgenden TLR2-TLR4-doppel-defizienten und RAGE-defizienten Mäusen rHMGB1 in die *Cisterna magna* injiziert. Sechs Stunden später zeigten RAGE-defiziente, nicht aber TLR2-TLR4-doppel-defiziente Mäuse signifikant geringere Leukozytenzahlen im Liquor als die entsprechenden Wildtyp-Mäuse.

Kurz zusammengefasst sprechen die Resultate dafür, dass HMGB1 im Liquor chemotaktisch auf Leukozyten wirken kann und dass dieser Effekt über RAGE vermittelt wird.

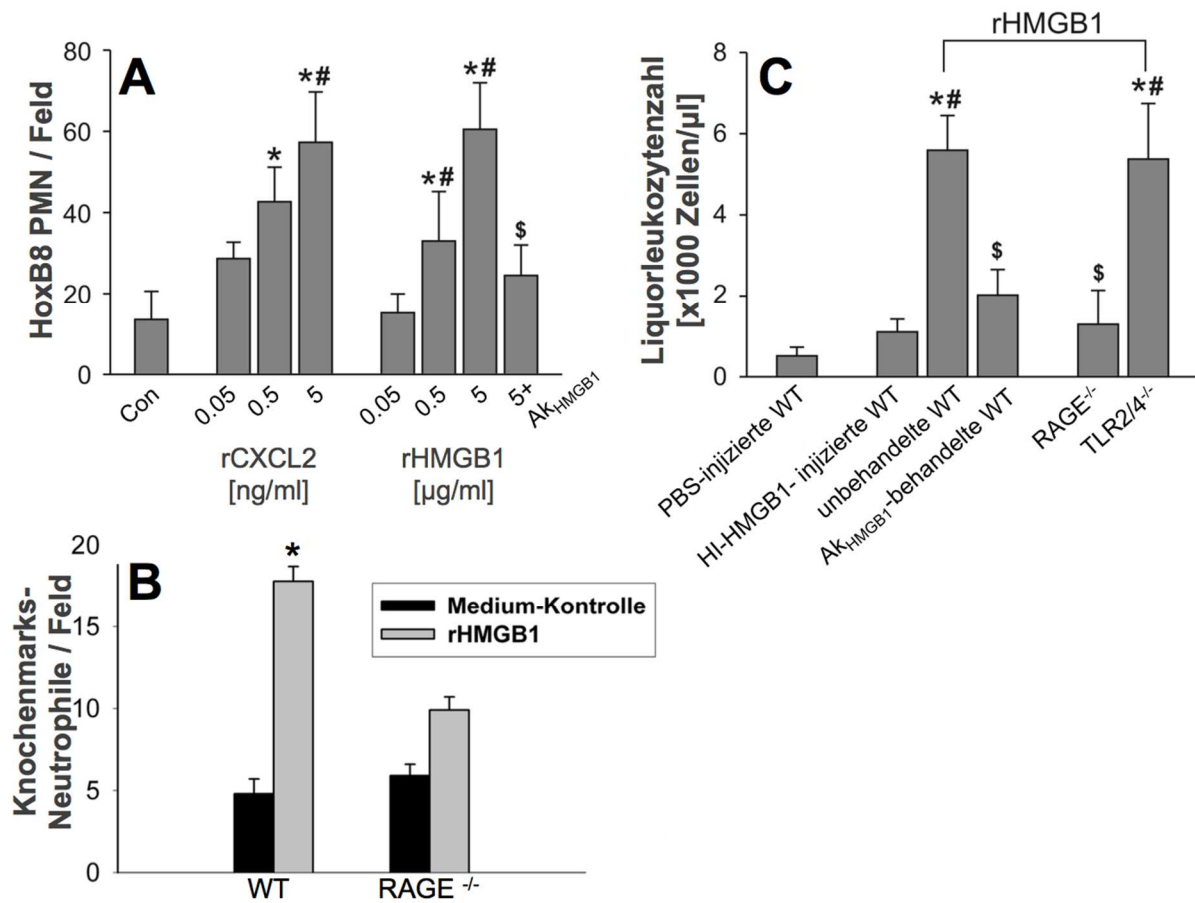


Abbildung 17: HMGB1 agiert im Liquor als Chemokin

[A] Der chemotaktische Effekt von rekombinantem HMGB1 (rHMGB1) auf Maus-Neutrophile (Hoxb8-Neutrophile) wurde *in vitro* in einer Mikrochemotaxie-Kammer analysiert. Rekombinantes CXCL2 (rCXCL2; n = 8 für jede Konzentration) diente als Positivkontrolle. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar. * P < 0.05, verglichen mit Medium-Kontrollen (Kon; n = 16); # P < 0.05, verglichen mit der Gruppe, die die jeweils niedrigste CXCL2- bzw. HMGB1-Konzentration erhielt; \$ P < 0.05 verglichen mit der Gruppe, die 5 µg/ml rHMGB1 erhielt, mittels ANOVA und Bonferroni's post hoc Test. [B] In Migrationsuntersuchungen an primären Knochenmarks-Granulozyten wirkte HMGB1 chemotaktisch auf Wildtyp (WT)-Neutrophile, nicht aber auf RAGE-defiziente (RAGE^{-/-})-Neutrophile. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar. * P < 0.05, verglichen mit Medium-behandelten WT-Neutrophilen und mit RAGE^{-/-}-Neutrophilen mittels ANOVA und Bonferroni's post hoc Test. [C] Um den chemotaktischen Effekt von rHMGB1 *in vivo* zu untersuchen, wurden 5 µg des Proteins in den Liquor injiziert und sechs Stunden später die Liquorleukozytenzahlen bestimmt. Ak_{HMGB1} = neutralisierende, direkt gegen HMGB1 gerichtete Antikörper (n = 4). RAGE^{-/-} = RAGE-defiziente Mäuse (n = 4). TLR2/4^{-/-} = TLR2- und TLR4-doppel-defiziente Mäuse (n = 4). WT = Wildtyp-Mäuse (n = 19 insgesamt). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. * P < 0.05, verglichen mit Kontrolltieren, die PBS intrazisternal appliziert erhalten hatten (Kon; n = 4); # P < 0.05, verglichen mit Wildtyp-

Mäusen, die 5 µg Hitze-inaktiviertes rHMGB1 intrazisternal appliziert erhalten hatten (HI-HMGB1; n = 4); \$ P < 0.05 verglichen mit WT (n= 7), die 5 µg rHMGB1, erhalten hatten, mittels ANOVA und Bonferroni's Test für post hoc Analysen.

4.4 Bedeutung von RAGE als wichtiger Rezeptor für HMGB1 bei der Pneumokokkenmeningitis

Vor dem Hintergrund, dass HMGB1 *per se* eine Liquorpleozytose induzieren kann, dieser Effekt RAGE-vermittelt zu sein scheint und rekombinantes Box A Protein die Bindung von HMGB1 an RAGE antagonisieren kann (Muhammad, S. et al., 2008), stellten wir die Hypothese auf, dass die HMGB1-vermittelten Effekte bei der Pneumokokkenmeningitis auf dessen Interaktion mit RAGE zurückzuführen seien.

Zunächst führten wir immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von RAGE *in vivo* im Maushirn durch (Abbildung 18). Bei Kontrollmäusen fand sich eine milde Färbung in der Wand großer meningealer Gefäße und in einigen leptomeningealen Zellen (Abbildung 18A). Bei infizierten Mäusen zeigte sich eine stark positive Färbung für RAGE in den Wänden großer Gefäße (Abbildung 18B, C). Zusätzlich konnte im entzündlichen Infiltrat ein positives Signal für RAGE nachgewiesen werden. Die Intensität der Färbung war in verschiedenen Stadien der Erkrankung (24 und 45 Stunden nach Infektion) gleich. Als ein Beleg für die Spezifität unserer immunhistochemischen Analysen fand sich im Hirngewebe RAGE-defizienter Tiere keine Anfärbung mit den verwendeten RAGE-Antikörpern (Abbildung 18D). Daneben fanden wir 24 und 45 Stunden nach Infektion eine HMGB1-spezifische Anfärbung mittels anti-HMGB1-Antikörpern im leukozytären Infiltrat und im Extrazellulärraum (Abbildung 19).

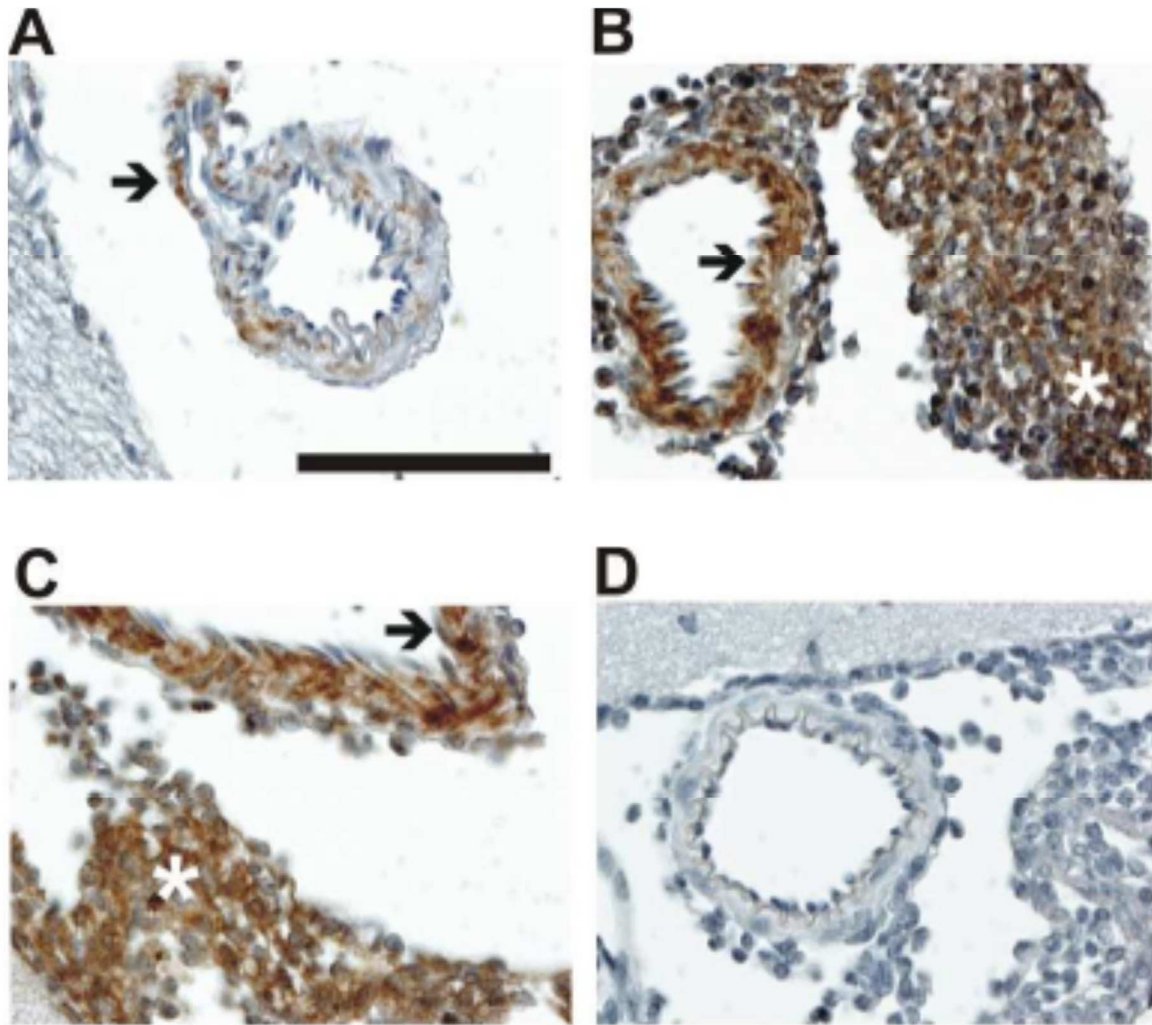


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von RAGE im Hirngewebe

[A] Immunhistochemische Analysen zeigten eine milde Färbung für RAGE in der Wand großer meningealer Gefäße von Kontrollmäusen. Der Skalierungsbalken in dieser Abbildung kennzeichnet 50 μm . [B, C] In Gehirnen infizierter Mäuse färbten sich die Wände großer Gefäße stark positiv für RAGE (Pfeile). Die Intensität der Färbung unterschied sich dabei nicht zwischen den verschiedenen Krankheitsstadien (24h [B] und 45h [C] nach Infektion). Auch im entzündlichen Infiltrat ließ sich RAGE anfärben (weiße Sternchen). [D] Im Gewebe RAGE-defizienter Mäuse fand sich keine RAGE-spezifische Anfärbung mit den anti-RAGE-Antikörpern.

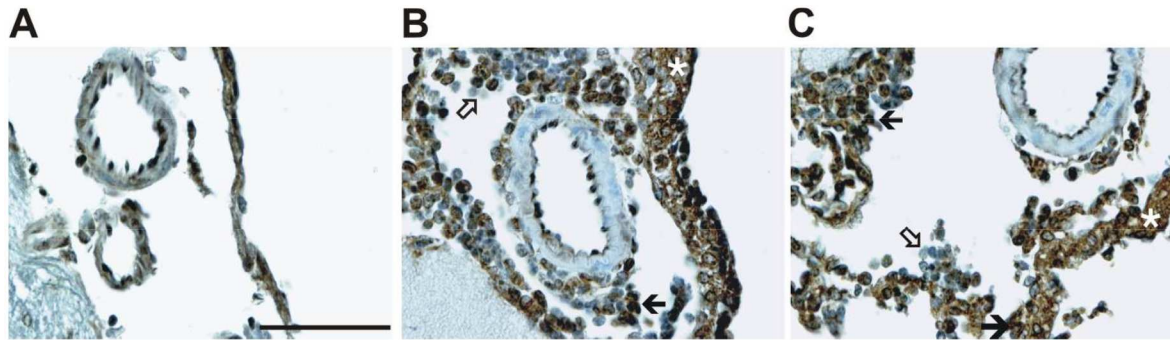


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von HMGB1 im Hirngewebe

[A] In Kontrollmäusen zeigten Zellen in den Leptomeningen und den Gefäßwänden eine positive Färbung für HMGB1. Der Skalierungsbalken in dieser Abbildung kennzeichnet 50 μ m. Bei Mäusen mit einer Meningitis war 24 [B] und 45 Stunden [C] *post infectionem* eine HMGB1-Färbung im leukozytären Infiltrat und im Extrazellulärraum (weißes Sternchen) nachweisbar. Das Färbemuster im Leukozyteninfiltrat war heterogen und reichte von stark angefärbten Bereichen (ausgefüllte Pfeile) bis zu Bereichen mit negativer Färbung (leere Pfeile); dies könnte auf eine Freisetzung von HMGB1 aus den entsprechenden (nicht angefärbten) Zellen hinweisen.

Um die funktionelle Bedeutung von RAGE zu analysieren, wurden RAGE-defiziente Mäuse (RAGE^{-/-}) mit *S. pneumoniae* intrazisternal infiziert. Die RAGE-Defizienz hatte keine Auswirkung auf die Entwicklung einer Meningitis, was sich in vergleichbaren Liquorleukozytenzahlen, bakteriellen Titern im Hirngewebe und klinischen Scorewerten von Wildtyp-Tieren (WT) und RAGE-defizienten Tieren 24 Stunden nach Infektion zeigte (Abbildung 20).

Dagegen fanden sich 45 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* bei mit Ceftriaxon behandelten RAGE-defizienten Tieren signifikant weniger Leukozyten im Liquor als bei entsprechenden Wildtyp-Mäusen (Abbildung 20A). Die Reduktion der Liquorpleozytose ging mit einem milderem Krankheitsverlauf einher, was durch einen signifikant geringeren klinischen Score deutlich wurde (Abbildung 20B). Die RAGE-Defizienz beeinflusste weder das bakterielle Wachstum noch die Ceftriaxon-induzierte bakterielle Elimination (Abbildung 20C). Eine zusätzliche Behandlung der RAGE-defizienten Tiere mit Ethylpyruvat (REPS) bewirkte weder eine weitere Abnahme der Liquorpleozytose noch eine Verbesserung des klinischen Status (Abbildung 20A, B).

Zusammengefasst sprechen diese Daten dafür, dass die Interaktion von HMGB1 mit RAGE bei der Aufrechterhaltung der leptomeningealen Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle spielt.

Ergebnisse

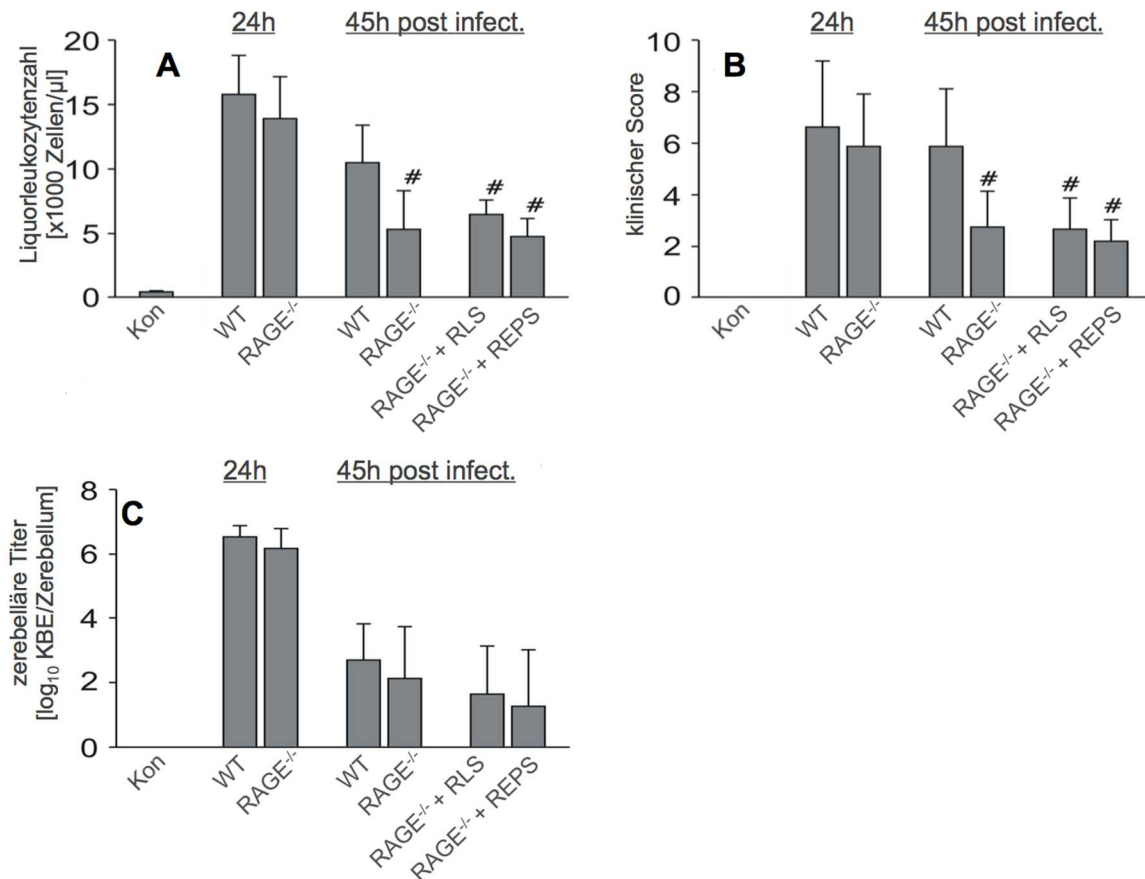


Abbildung 20: HMGB1-Effekte erfordern die Interaktion mit RAGE

Wildtyp- und RAGE-defiziente Mäuse wurden 24 Std. nach Infektion evaluiert bzw. 21 Std. nach Infektion antibiotisch mit Ceftriaxon behandelt und weitere 24 Std. später (45 Std. nach Infektion) evaluiert (n = 7). Kontrolltiere (Kon; n = 4) erhielten PBS intrazisternal verabreicht. [A-C] Fünfundvierzig, nicht aber vierundzwanzig Stunden *post infectionem* unterschieden sich RAGE-defiziente (RAGE^{-/-}) Mäuse hinsichtlich der Liquorleukozytenzahlen und des klinischen Scores signifikant von Wildtyp (WT)-Mäusen. Eine zur antibiotischen Behandlung additive Therapie RAGE-defizienter Mäuse mit Ethylpyruvat (REPS; n = 6) erbrachte keine weiteren Veränderungen im Vergleich zu Placebo-behandelten (Ringerlaktat-Lösung; RLS; n = 6) RAGE-defizienten Mäusen. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar. # P < 0.05, im Vergleich mit infizierten Wildtyp-Mäusen (WT), die 45 Stunden nach Infektion beurteilt wurden, mittels ANOVA und Bonferroni's Test für post hoc Analyse.

4.5 Mechanismus der HMGB1-Freisetzung

Um die HMGB1-Freisetzung während einer Pneumokokkeninfektion genauer zu charakterisieren, wechselten wir in ein Zellkultursystem. Dabei stimulierten wir murine J774.2-Makrophagen mit Hitze-getöteten Pneumokokken (HKPs) und analysierten die Freisetzung von HMGB1 in den Zellkultur-Überstand mit Hilfe von Western Blot-Untersuchungen. Bei diesen Analysen zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige

Freisetzung von HMGB1 aus den Makrophagen. Die Freisetzung wurde ab der vierten Stunde und bei Konzentrationen von über 2×10^7 KBE/ml beobachtet (Abbildung 21A) und ging mit einer partiellen Lyse der Makrophagen einher, was sich durch den Anstieg der Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand quantifizieren ließ (Abbildung 21B).

Studien zeigten kürzlich, dass die HMGB1-Freisetzung Inflammasom- und Caspase-1-abhängig durch unkonventionelle Proteinsekretion oder als Folge einer Zelllyse bei Pyroptose erfolgen kann (Lamkanfi, M. et al., 2010; Lu, B. et al., 2012). Die Inflammasom-Aktivierung wiederum wird durch eine Infektion mit Pneumokokken getriggert (Hoegen, T. et al., 2011; Witzenrath, M. et al., 2011). Zentrale Elemente der Inflammasom-Aktivierung bei Pneumokokkeninfektionen sind die Freisetzung von ATP und ein Kalium-Ausstrom in den Extrazellulärraum (Hoegen, T. et al., 2011; Petrilli, V. et al., 2007). Zudem spielen P2X7-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Induktion des NLRP3/Caspase-1-Inflammasom-Signalkomplexes (Di Virgilio, F., 2007; Dubyak, G. R., 2012). Zur Analyse der HMGB1-Freisetzung führten wir Inhibitor-Untersuchungen mit dem Caspase-1-Antagonisten z-YVAD-fmk, den P2X7-Purinrezeptor-Antagonisten ox-ATP und A438079 und einer erhöhten extrazellulären Kalium-Konzentration durch. Der Effekt dieser Substanzen als Inflammasom-Hemmstoffe wurde durch die Bestimmung von IL-1 β mittels ELISA überprüft. Im Überstand von Zellen, die mit z-YVAD-fmk, P2-Purinrezeptor-Antagonisten oder hohen extrazellulären Kalium-Konzentrationen behandelt worden waren, kam es zu keinem Anstieg der IL-1 β -Konzentrationen nach der Exposition mit HKPs. Weder eine Behandlung mit z-VAD-fmk noch die Zugabe von Kaliumchlorid beeinflusste die HMGB1- und LDH-Freisetzung von J774.2-Zellen (Abbildung 21C, D). Dementsprechend fanden sich gleiche Konzentrationen an HMGB1 im Überstand von Wildtyp- und ASC-defizienten BMDM-Zellen (primären Knochenmarks-Makrophagen ASC-defizienter Mäuse; ASC ist ein Inflammasom-Adapter-Protein) (Abbildung 21E). Auch eine Behandlung mit dem selektiven Purinrezeptor-Antagonisten A438079 konnte die Pneumokokken-induzierte HMGB1- und LDH-Freisetzung nicht beeinflussen. Dagegen verhinderte die Zugabe von ox-ATP die Freisetzung von HMGB1 und LDH völlig (Abbildung 21C, D).

Loukili et al. (2011) gingen davon aus, dass oxidativer Stress (z.B. Peroxynitrit) durch Nekrose eine passive Freisetzung von HMGB1 in den Extrazellulärraum verursachen kann (Loukili, N. et al., 2011). Um diesen Aspekt der HMGB1-Freisetzung zu untersuchen, wurden J774.2-Zellen mit den Antioxidantien DPI, NAC und MnTBAP behandelt. Keine dieser Substanzen wirkte protektiv gegen die Pneumokokken-induzierte Zellschädigung.

Ergebnisse

Ebensowenig wurde durch diese Hemmstoffe die HMGB1-Freisetzung beeinflusst (Abbildung 21F). Dagegen führte die Zugabe von Ethylpyruvat (EP) zu ähnlichen Ergebnissen wie bei der *in vivo* Behandlung: Die HMGB1-Konzentrationen im Zellüberstand waren bei mit Ethylpyruvat behandelten Zellen deutlich geringer als bei unbehandelten Kontrollzellen. Gleichzeitig verminderte Ethylpyruvat dabei auch die Pneumokokken-induzierte Zelllyse (um $41.4 \% \pm 2.9 \%$; 10 mM Ethylpyruvat), konnte diese aber nicht komplett verhindern.

Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass HMGB1 während einer Pneumokokken-Infektion infolge eines – von Inflammasom und oxidativem Stress unabhängigen – Todes von Makrophagen in den Extrazellulärraum gelangt.

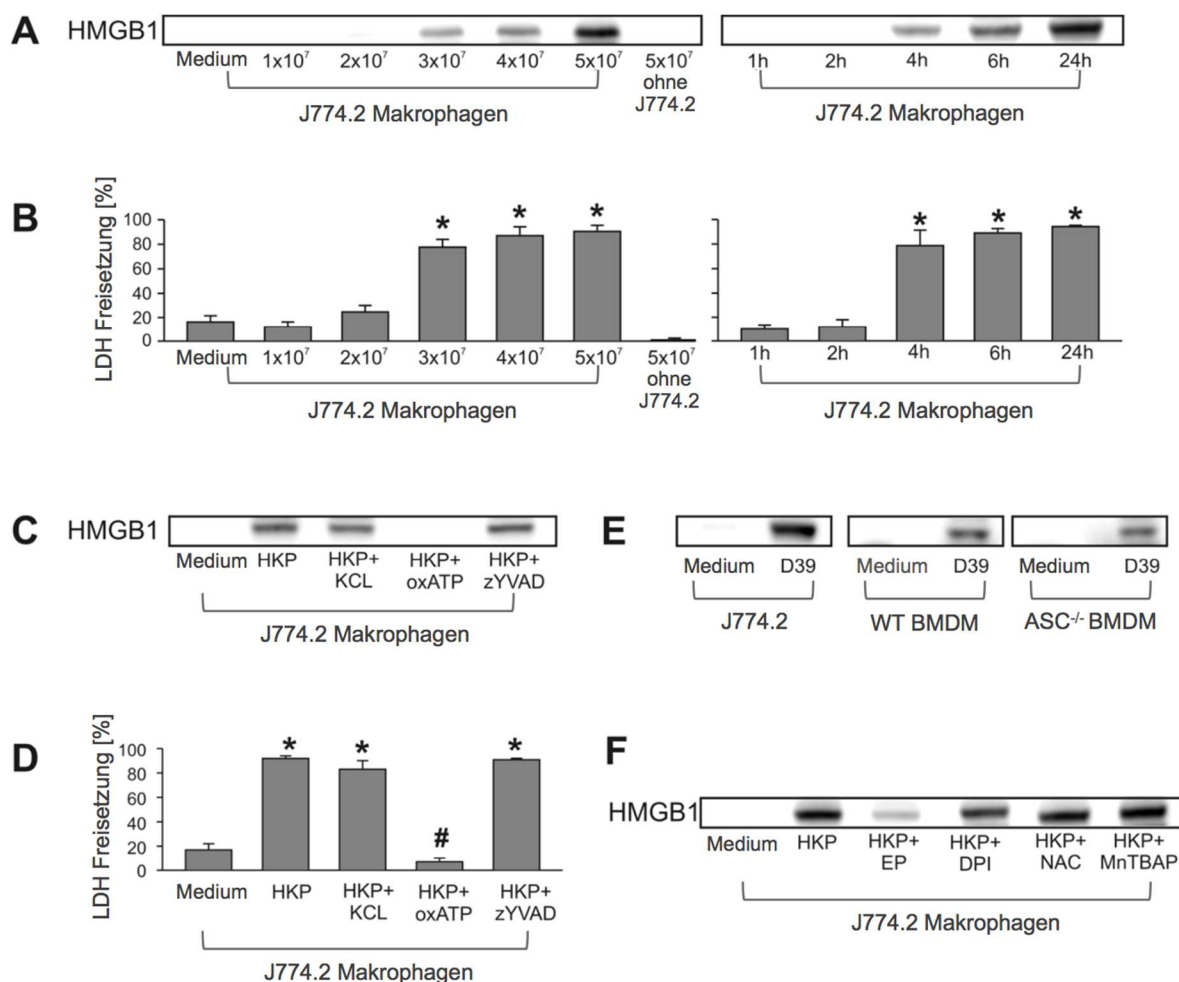


Abbildung 21: Die HMGB1-Freisetzung von Makrophagen erfolgt passiv und unabhängig von Inflammasom-Aktivierung und oxidativem Stress

HMGB1-Konzentrationen wurden mittels Western Blot-Analysen in Zellkultur-Überständen von J774.2-Makrophagen und primären Knochenmarks-Makrophagen (BMDM; *bone marrow-derived macrophages*) analysiert. Zelltod wurde durch die Messung der freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Die LDH-

Ergebnisse

Aktivität wurde in Zellkultur-Überständen (Ü), Überständen lysierter Kontrollzellen (Positiv-Kontrolle; PK) und Kontrollmedium (Negativ-Kontrolle; NK) kolorimetrisch gemessen. Die Zytotoxizität wurde als Prozent der LDH-Freisetzung nach folgender Formel berechnet: $\frac{\text{Ü}-\text{NK}}{\text{PK}-\text{NK}} \times 100$. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Zellen mit 5×10^7 KBE/ml Hitze-inaktivierten Pneumokokken (HKP) stimuliert. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar. * $P < 0.05$, verglichen mit nicht-stimulierten Zellen (Medium; $n = 6$); # $P < 0.05$, verglichen mit HKP-stimulierten Zellen, mittels ANOVA und Bonferroni's Test für post-hoc Analysen.

5 Diskussion

Experimentelle Untersuchungen der letzten Jahrzehnte zeigten, dass vor allem die massive neutrophile Entzündungsreaktion für die Entstehung von Hirnschäden während einer Meningitis verantwortlich ist (Gerber, J. und Nau, R., 2010; Koedel, U. et al., 2010a). Von früheren Studien war zudem bekannt, dass [i] nach Beginn einer antibiotischen Behandlung einer Pneumokokkenmeningitis Pathogen-assoziierte „Alarmsignale“ wie Lipoteichonsäure innerhalb weniger Stunden (8-16 Std.) weitgehend aus dem Liquorraum eliminiert werden, [ii] die Entzündungsreaktion oft aber nur verzögert abklingt. Unsere Untersuchungen zeigten nun zum ersten Mal, dass endogene Alarmsignale eine entscheidende Rolle in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis spielen (Blazer, S. et al., 1983; Viallon, A. et al., 2005). Im Einzelnen beobachteten wir, dass [i] HMGB1 bei Patienten und Mäusen mit einer Pneumokokkenmeningitis in großen Mengen in den Liquor freigesetzt wird, dass [ii] die Antagonisierung von HMGB1 das Fortschreiten, nicht aber die Entwicklung einer Meningitis einschränkt, was zu einem geringeren Ausmaß an Hirnschädigung und zu einer Verbesserung des Akutverlaufes dieser Erkrankung führt, und dass [iii] HMGB1 dabei vor allem chemotaktisch durch die Interaktion mit RAGE wirkt.

5.1 HMGB1 als später Entzündungsmediator

In einer kürzlich publizierten Fallstudie wurde von erhöhten HMGB1-Spiegeln im Liquor von Kindern mit einer bakteriellen Meningitis (3 der 13 Kindern litten an einer Pneumokokkenmeningitis), im Vergleich zu Kindern ohne oder mit aseptischer Meningitis berichtet (Tang, D. et al., 2008). Übereinstimmend damit fanden wir große Mengen an HMGB1 im Liquor von erwachsenen Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis sowie von Mäusen mit einer experimentellen Pneumokokkenmeningitis. Im Mausmodell zeigte sich ein deutlicher Anstieg von HMGB1 im Liquor im Krankheitsverlauf einer Meningitis (zwischen 24 und 45 Stunden nach Infektion). Diese Beobachtung deckt sich mit dem gegenwärtigen, vor allem anhand von Untersuchungen zur Sepsis erstellten Konzept der HMGB1-Freisetzung (Andersson, U. und Tracey, K. J., 2011). HMGB1 gilt als später Entzündungsmediator, der von Makrophagen infolge eines Kontaktes mit PAMPs oder als Reaktion auf proinflammatorische Stimuli (z.B. Zytokine) aktiv in den Extrazellulärraum freigesetzt wird (Jiang, W. und Pisetsky, D. S., 2006; Wang, H. et al., 1999).

5.2 Freisetzung von HMGB1

Um Einblicke in den Mechanismus der HMGB1-Freisetzung zu erhalten, stimulierten wir murine J774.2-Makrophagen mit Pneumokokken. Vier Stunden nach Stimulationsbeginn konnte erstmals HMGB1 im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Die HMGB1-Freisetzung korrelierte dabei positiv mit der Freisetzung von LDH, einem Indikator für eine Desintegration der Zellmembran und somit für einen nekrotischen Zelltod. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Studien überein, die zeigen konnten, dass Makrophagen (und andere Zellen) HMGB1 als Reaktion auf bakterielle Bestandteile wie Peptidoglykan (Rose, J. A. et al., 2011) oder lebende Bakterien wie *Streptococcus suis*, *Klebsiella pneumoniae* und *Shigella flexneri* (Tenenbaum, T. et al., 2006; Willingham, S. B. et al., 2009; Willingham, S. B. et al., 2007) passiv, wahrscheinlich als Folge eines inflammatorischen Zelltodes, wie Pyroptose und Pyronekrose (Fernandes-Alnemri, T. et al., 2007; Willingham, S. B. et al., 2007), freisetzen. In der Signalübertragung beider Zelltodprogramme nimmt das Inflammasom-Adapter-Protein ASC eine Schlüsselfunktion ein. Die Aktivierung von Caspase-1 spielt dagegen lediglich bei der Pyroptose, nicht aber der Pyronekrose eine Rolle. Anhand unserer Untersuchungen mit pharmakologischen Hemmstoffen und ASC-defizienten Zellen konnten wir zeigen, dass der Pneumokokken-induzierte Zelltod von J774.2-Makrophagen unabhängig von der Aktivierung des Inflammasoms, der Caspase-1 sowie von ASC stattfindet. So fanden sich keine Unterschiede in den Konzentrationen von HMGB1 und LDH in den Zellkulturüberständen von Knochenmarks-Makrophagen von Wildtyp-Tieren und ASC-defizienten Tieren. Ebenso konnte weder eine Behandlung mit dem Caspase-1-Hemmstoff z-YVAD-fmk noch eine gezielte Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentrationen die Pneumokokken-induzierte Freisetzung von HMGB1 und LDH beeinflussen. Durch die starke Erhöhung der extrazellulären Kaliumspiegel kann der Ausstrom des Ions aus dem Zellinnern vermindert werden; dieser stellt einen wichtigen Schritt in der Aktivierungskaskade des Inflammasoms dar (Petrilli, V. et al., 2007).

Die Freisetzung von HMGB1 und LDH aus stimulierten Makrophagen wurde durch die Zugabe von oxidiertem ATP (ox-ATP), nicht aber A438079, blockiert. Da sowohl ox-ATP als auch A438079 bekannte P2X7-Rezeptor-Antagonisten darstellen, dürfte die Inhibition der HMGB1-Freisetzung auf einem von P2X7-unabhängigen Effekt des ox-ATPs beruhen, wie beispielsweise einer Beeinflussung der Toll like-Rezeptor-Aktivierung oder einer Blockade nachfolgender Signalkaskaden. Im Jahre 1999 demonstrierten Sikora und Kollegen durch Untersuchungen an Makrophagen von Wildtyp- und P2X7-Rezeptor-defizienten Mäusen, dass

ox-ATP P2X7-Rezeptor-unabhängig die Sauerstoffradikal- und Stickoxid-Produktion von Makrophagen, die mit Tuberkelbakterien infiziert wurden, inhibieren kann (Sikora, A. et al., 1999). In Übereinstimmung mit dieser Publikation zeigten Beigi et al. (2003), dass ox-ATP die Zytokin- und/oder Endotoxin-induzierte Freisetzung proinflammatorischer Moleküle (wie z.B. IL-8) aus humanen Zellen, die keine P2X7-Rezeptor-Expression aufweisen, hemmen kann. In der Diskussion ihrer Befunde nannte die Autorengruppe um Beigi die Hemmung der Aktivierung von Zytokin- und/oder Toll-like Rezeptoren sowie die Blockade nachfolgender, intrazellulärer Signalkaskaden als mögliche Wirkmechanismen (Beigi, R. D. et al., 2003). Ebenso berichteten Chen et al. (2006) von P2X7-Rezeptor-unabhängigen Effekten von ox-ATP: Ox-ATP bewirkte sowohl bei P2X7-Rezeptor-positiven RBA-2-Astrozyten als auch bei P2X7-Rezeptor-negativen IA-1g1-Astrozyten eine Verringerung der intrazellulären Superoxid-Konzentrationen. Untersuchungen von Moayeri et al. (2006) zur toxischen Wirkung des Letalen Toxins (LT) von *Bacillus anthracis* zeigten, dass ox-ATP Makrophagen vor der durch das Toxin vermittelten Lyse schützen kann; andere P2- und P2X7-Antagonisten zeigten dagegen keinen protektiven Effekt. Zudem konnte eine Behandlung mit ox-ATP die tödliche Wirkung von LT auf BALB/c-Mäuse verhindern. Als möglichen Wirkmechanismus von ox-ATP beschrieben die Autoren eine verminderte Ansäuerung von Endosomen, die der Bildung eines SDS-resistenten Oligomers aus Protektivem Antigen, einer Untereinheit von LT, entgegenwirkt wird. Dadurch wird die Translokation des Letalfaktors, einer weiteren Untereinheit des Toxins, in das Zytosol und konsekutiv dessen Wirkung verhindert.

Makrophagen sind in der Lage, nach Stimulation durch Pneumokokken reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freizusetzen (Koedel, U. und Pfister, H. W., 1999). Diese könnten zum beobachteten Zelltod und somit auch zur Freisetzung von HMGB1 in unserem Modell beitragen (Loukili, N. et al., 2011; Tang, D. et al., 2007). Allerdings konnte in unseren Untersuchungen keine der getesteten Substanzen, weder der Peroxynitrit-Fänger MnTBAP, noch der NADPH-Oxidase-Hemmstoff DPI, noch der Wasserstoffperoxid-Fänger NAC, die Freisetzung von LDH und HMGB1 nach Pneumokokken-Exposition beeinflussen.

Somit legen diese Daten nahe, dass die Pneumokokken-induzierte Freisetzung von HMGB1 den Tod von Zellen voraussetzt, der durch ox-ATP verhindert werden kann, aber unabhängig vom P2X7-Rezeptor sowie einer Inflammasom-Aktivierung und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist. Um den genauen Mechanismus der Hemmung des Zelltodes durch ox-ATP zu klären, sind weitere Studien notwendig.

5.3 Funktion von HMGB1 in der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis

Extrazelluläres HMGB1 kann als DAMP fungieren: Dabei kann HMGB1 sowohl [i] das angeborene Immunsystem zur Initiierung einer Abwehrreaktion anregen, als auch [ii] eine Entzündungsreaktion bei weiterhin bestehender Gefahr aufrechterhalten (Andersson, U. und Tracey, K. J., 2011). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von HMGB1-Antagonisten nicht die Entstehung, sondern vielmehr die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion während einer antibiotischen Therapie beeinflusste. In Zusammenschau mit kürzlich gewonnenen Erkenntnissen über die proinflammatorische Aktivität von subkapsulären Pneumokokkenfragmenten (Kadioglu, A. et al., 2008; Paterson, G. K. und Mitchell, T. J., 2006) lässt sich aus unseren Beobachtungen folgendes Konzept zur Immunregulation bei der Pneumokokkenmeningitis ableiten: Die Induktion der Meningitis scheint in erster Linie von der Anwesenheit exogener Alarmsignale (PAMPs) abzuhängen. Sobald *Streptococcus pneumoniae* in den Liquorraum eingedrungen ist, kann es sich dort aufgrund der lokalen Infektabwehrschwäche leicht vermehren. Diese wird in erster Linie auf das Fehlen löslicher Mustererkennungsrezeptoren, wie z.B. Komplementfaktoren, zurückgeführt (Koedel, U. et al., 2010a). Das bakterielle Wachstum führt zur Azidose im Liquor, wodurch die Autolyse von Bakterien getriggert wird (Pinas, G. E. et al., 2008). In der Folge werden Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren und andere Bestandteile der Pneumokokken in den Liquor freigesetzt. Deren Erkennung durch Mustererkennungsrezeptoren, wie TLR2 und TLR4 (Koedel, U. et al., 2010a), löst eine Entzündungsreaktion aus, die allerdings das bakterielle Wachstum nicht entscheidend begrenzen kann (Ernst, J. D. et al., 1983). Die Bakterien können sich daher stark vermehren und erreichen Konzentrationen (über 10^7 KBE/ml), die in unseren Untersuchungen sowie in Zellkulturstudien anderer Arbeitsgruppen zytotoxisch wirkten (Kim, Y. S. et al., 1995). Aus den geschädigten wirtseigenen Zellen wird in der Folge HMGB1 passiv freigesetzt und verstärkt dann aufgrund seiner proinflammatorischen Eigenschaften die Entzündungsreaktion.

In dieser Studie wurden die Mäuse antimikrobiell therapiert, um ihren Tod durch die schwere Infektion zu verhindern. Die antibiotische Behandlung bewirkt eine rasche Elimination der Bakterien und ihrer Fragmente aus dem Liquorraum innerhalb von 6 bis 10 Stunden (Gerber, J. et al., 2003; Kanegaye, J. T. et al., 2001; Stucki, A. et al., 2007). Allerdings geht die rasche Beseitigung der Bakterien nicht mit einem ebenso schnellen Abklingen der Entzündungsreaktion einher. Dies kann – zumindest zu einem gewissen Teil – durch die Beobachtungen unserer Studie erklärt werden, dass das endogene Alarmsignal HMGB1

während der Meningitis in den Liquor freigesetzt wird und dort die Entzündung aufrechterhält.

5.4 Wirkungsweise von HMGB1

HMGB1 kann auf verschiedenen Wegen zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion beitragen; diese sollen im Folgenden diskutiert werden.

5.4.1 HMGB1 als Zytokin-ähnlicher Mediator

Vieles weist darauf hin, dass HMGB1, sobald es von Zellen freigesetzt wurde, als Zytokin-ähnlicher proinflammatorischer Mediator agieren kann (Abraham, E. et al., 2000; Wang, H. et al., 1999), indem es Immun- und Endothelzellen zur Produktion anderer proinflammatorischer Faktoren aktiviert. So zeigten Andersson und Kollegen (2000), dass die Applikation von rekombinantem HMGB1 die Expression von TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6 und IL-8 von Monozyten stimuliert. Untersuchungen an menschlichen Endothelzellen berichten über eine verstärkte Expression von u.a. TNF- α , IL-8 und Monozyten-chemotaktischem Protein 1 (MCP-1) nach einer Stimulation mit rekombinantem humanem HMGB1 (Fiuza, C. et al., 2003). Auch Astrozyten reagieren nach Exposition mit HMGB1 mit einer verstärkten Produktion inflammatorischer Mediatoren (Pedrazzi, M. et al., 2007). Ferner kann HMGB1 in menschlichen Neutrophilen die Produktion proinflammatorischer Moleküle wie TNF- α , IL- β und IL-8 induzieren (Park, J. S. et al., 2003). In *in vitro* Untersuchungen zur Osteoporose konnte zudem gezeigt werden, dass rekombinantes HMGB1 die Expression von TNF- α , IL-1 α , IL-1, IL-1 β und IL-6 bei RAW-C3 Osteoklastenvorläufer-Makrophagen stimuliert (Yamoah, K. et al., 2008).

Yang et al. (2010) stellten eine Zelllinie aus den Ovarien chinesischer Hamster her, die konstitutiv HMGB1 sezernierte. Wurden murine Makrophagen dem Medium dieser Zellen ausgesetzt, bildeten sie vermehrt das proinflammatorische Zytokin TNF- α . In weiteren Untersuchungen an Makrophagen von Knockout-Mäusen konnte diese Arbeitsgruppe demonstrieren, dass die HMGB1-abhängige Freisetzung von TNF aus Makrophagen TLR4-abhängig erfolgte. Yu und Kollegen (2006) wiederum beschrieben differenzierte Interaktionen von HMGB1 mit TLR2 und TLR4: So verringerten neutralisierende Antikörper gegen TLR4, nicht aber gegen TLR2 und RAGE, die HMGB1-induzierte IL-8-Synthese im menschlichen Vollblut. Bei menschlichen Makrophagen konnte die HMGB1-induzierte

Produktion von TNF ebenfalls gehemmt werden. Diese war nach einer Exposition mit HMGB1 bei Makrophagen von TLR4- oder MyD88-defizienten Mäusen signifikant geringer als bei Wildtyp-Mäusen oder TLR2-defizienten Mäusen. Bei HEK-293 Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen; *Human Embryonic Kidney Cells*) allerdings, die vorab mit TLR2 oder TLR4 transfiziert worden waren, führte die Stimulation mit HMGB1 nur bei TLR2-überexprimierenden Zellen zur IL-8-Freisetzung. Eine weitere Arbeitsgruppe demonstrierte eine TLR2- und TLR4-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Folge einer Stimulation von murinen Makrophagen mit rekombinantem HMGB1 (Park, J. S. et al., 2004). Neben dieser vermutlich direkten Zytokin-ähnlichen Aktivität kann HMGB1 Komplexe mit exogenen und endogenen proinflammatorischen Molekülen (wie LPS oder IL-1 β) bilden, und in Abhängigkeit vom Partnermolekül und dessen Rezeptor (z.B. IL-1 β und IL-1R) die entsprechenden biologische Aktivität entfalten (Bianchi, M. E., 2009).

In unserer Studie unterschied sich die Kinetik der HMGB1-Freisetzung in den Liquor deutlich von der Freisetzung der proinflammatorischen Faktoren IL-1 β , CXCL1 und CXCL2: Während die Konzentrationen der genannten proinflammatorischen Faktoren 24 Stunden nach Beginn der antimikrobiellen Behandlung nahezu im Normbereich lagen, waren die HMGB1-Spiegel in diesem Zeitraum nochmals angestiegen. Zudem wurden im Mausmodell weder durch eine Vor- noch durch eine Nachbehandlung mit HMGB1-Antagonisten die Zytokin- und Chemokinproduktion im Gehirn beeinflusst.

Zusammengefasst sprechen diese Daten gegen die These einer Zytokin-ähnlichen Funktion von HMGB1 bei der Pneumokokkenmeningitis, wie sie in anderen Krankheitsmodellen, z.B. der Sepsis, demonstriert worden war (Wang, H. et al., 1999; Yang, H. et al., 2004).

5.4.2 Effekte von HMGB1 auf Apoptose und Bakterienelimination

Als weitere proinflammatorische Mechanismen von HMGB1 werden in der aktuellen Literatur [i] eine Inhibition der Apoptose und Efferozytose von Granulozyten (Feng, Y. et al., 2008; Liu, G. et al., 2008) sowie [ii] eine Einschränkung der Bakterienelimination propagiert. So zeigten Tadie et al. (2012), dass eine Inkubation neutrophiler Granulozyten mit rekombinantem HMGB1 mit einer geringeren Aktivierung des Enzyms NADPH-Oxidase nach einer Exposition mit *Escherichia coli* (*E. coli*) und folglich einem geringeren Abtöten der Bakterien einhergeht. Verwendeten die Autoren anstelle des intakten Moleküls ein HMGB1-Molekül, dem das carboxyterminale Ende fehlte, konnte diese biologische Aktivität

nicht beobachtet werden. Da die beschriebene Deletion einen Verlust der Bindung an RAGE bedingt, RAGE wiederum die Elimination von *E. coli* entscheidend beeinflussen kann, schlussfolgerte die Autorengruppe, dass diese biologische Aktivität von HMGB1 von dessen Interaktion mit RAGE abhängig ist. Im Mausmodell konnten diese Befunde nachvollzogen werden: So führte die gleichzeitige intraperitoneale Applikation von *E. coli* und HMGB1 zu erhöhten Bakterientitern in der Peritonealflüssigkeit (im Vergleich zur alleinigen *E. coli*-Inokulation) (Tadie, J. M. et al., 2012). Ferner beobachteten van Zoelen und Kollegen (2009a) bei Untersuchungen in einem Mausmodell der Pneumokokken-Pneumonie, dass RAGE-defiziente Mäuse eine geringere pulmonale Bakterienlast und verminderte Aussaat der Bakterien in die Blutbahn und Milz aufwiesen als entsprechende Wildtyp-Mäuse (van Zoelen, M. A. et al., 2009a). Zudem beobachteten diese Autoren, dass RAGE-defiziente Makrophagen eine verbesserte Fähigkeit zur Tötung von *S. pneumoniae* besitzen (van Zoelen, M. A. et al., 2009a).

In unserer Studie erbrachte eine Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit HMGB1-Antagonisten keine Unterschiede der Bakterientiter im Gehirn gegenüber unbehandelten Tieren. Zudem konnten wir keine signifikanten Unterschiede bei den bakteriellen Titern im Hirn und Blut zwischen RAGE-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen feststellen. Der ausbleibende Effekt der HMGB1-Inhibitoren und der RAGE-Defizienz auf das bakterielle Wachstum beruht möglicherweise auf der lokalen Infektabwehrschwäche im Liquorraum; diese macht es Neutrophilen nahezu unmöglich, Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* zu töten (Ernst, J. D. et al., 1983).

Bei der Pneumokokkenmeningitis finden sich massenhaft Neutrophile im Liquor. Eine Verlängerung der Überlebenszeit dieser Zellen durch HMGB1 könnte zur Persistenz des granulozytären Infiltrats beitragen. In mehreren Zellkulturstudien war bereits gezeigt worden, dass HMGB1 die Apoptose neutrophiler Granulozyten sowie deren Phagozytose durch Makrophagen hemmen kann (Banerjee, S. et al., 2010; Friggeri, A. et al., 2010; Liu, G. et al., 2008). In unserer Untersuchung fanden wir keine Unterschiede in der Zellzusammensetzung und dem Anteil apoptotischer Zellen im Liquor zwischen Mäusen, die mit dem HMGB1-Inhibitor Ethylpyruvat behandelt worden waren, und Mäusen, die dessen Vehikelsubstanz erhalten hatten.

In der Gesamtheit sprechen diese Daten dafür, dass das schnellere Abklingen der Entzündungsreaktion, wie es bei Mäusen mit RAGE-Defizienz oder nach Behandlung mit

HMGB1-Antagonisten beobachtet werden konnte, nicht auf einer verstärkten Apoptose von Granulozyten oder einer effizienteren Elimination der Pneumokokken zu beruhen scheint.

5.4.3 RAGE-vermittelte chemotaktische Effekte von HMGB1

Ein weiterer Mechanismus, mit dem HMGB1 zur Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion beitragen könnte, ist die Rekrutierung von Leukozyten. Aktuelle Studien demonstrieren, dass HMGB1, entweder selbstständig oder in Komplex mit Chemokinen wie CXCL12 (Schiraldi, M. et al., 2012), die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten *in vitro* und *in vivo* steuern kann (Orlova, V. V. et al., 2007; Rouhiainen, A. et al., 2004; Schiraldi, M. et al., 2012). Der chemotaktische Effekt von HMGB1 scheint dabei über dessen Interaktion mit RAGE vermittelt zu werden (Orlova, V. V. et al., 2007; Penzo, M. et al., 2010; Rouhiainen, A. et al., 2004). Zudem kann HMGB1 indirekt die Rekrutierung von Leukozyten regulieren, indem es durch Aktivierung von TLR2 und TLR4 die Produktion von Chemokinen induzieren kann (Berthelot, F. et al., 2012; van Zoelen, M. A. et al., 2009b).

In unserer Studie führte die Behandlung mit HMGB1-Antagonisten zu einer signifikanten Verringerung der Liquorpleozytose (45 Stunden nach Infektion), ohne dabei aber die Expression der bei der Pneumokokkenmeningitis wichtigen Chemokine CXCL1 und CXCL2 im Gehirn zu beeinflussen; dies ist als Hinweis auf einen direkten Effekt von HMGB1 auf die Rekrutierung von Leukozyten zu werten. Diese Hypothese wird von folgenden weiteren Beobachtungen bekräftigt: [i] in Migrationsuntersuchungen wanderten Neutrophile RAGE-abhängig in Richtung von HMGB1; [ii] durch die intrazisternale Applikation von rekombinantem HMGB1 *per se* ließ sich eine Liquorpleozytose induzieren, die abhängig von RAGE, nicht aber von TLR2 und TLR4 war; [iii] eine RAGE-Defizienz führte zu einer ähnlichen Reduktion der Liquorpleozytose, wie sie bei der Behandlung mit HMGB1-Inhibitoren beobachtet werden konnte, und [iv] bei RAGE-defizienten Mäusen erbrachte die Antagonisierung von HMGB1 keine weitere Verringerung der Liquorpleozytose.

Insgesamt demonstrierte unsere Studie, dass die verzögerte Auflösung der Entzündungsreaktion bei einer antibiotisch behandelten Pneumokokkenmeningitis – zumindest zu einem gewissen Teil – durch die Freisetzung des endogenen Alarmsignals HMGB1 aus sterbenden Zellen bedingt wird. In diesem Zusammenhang wirkt freigesetztes HMGB1 chemotaktisch auf Leukozyten, wie neutrophile Granulozyten. Die chemotaktische Wirkung von HMGB1 wird dabei durch dessen Interaktion mit RAGE vermittelt.

5.4.4 Pathogenese-Modell der Pneumokokkenmeningitis unter Einbeziehung von HMGB1

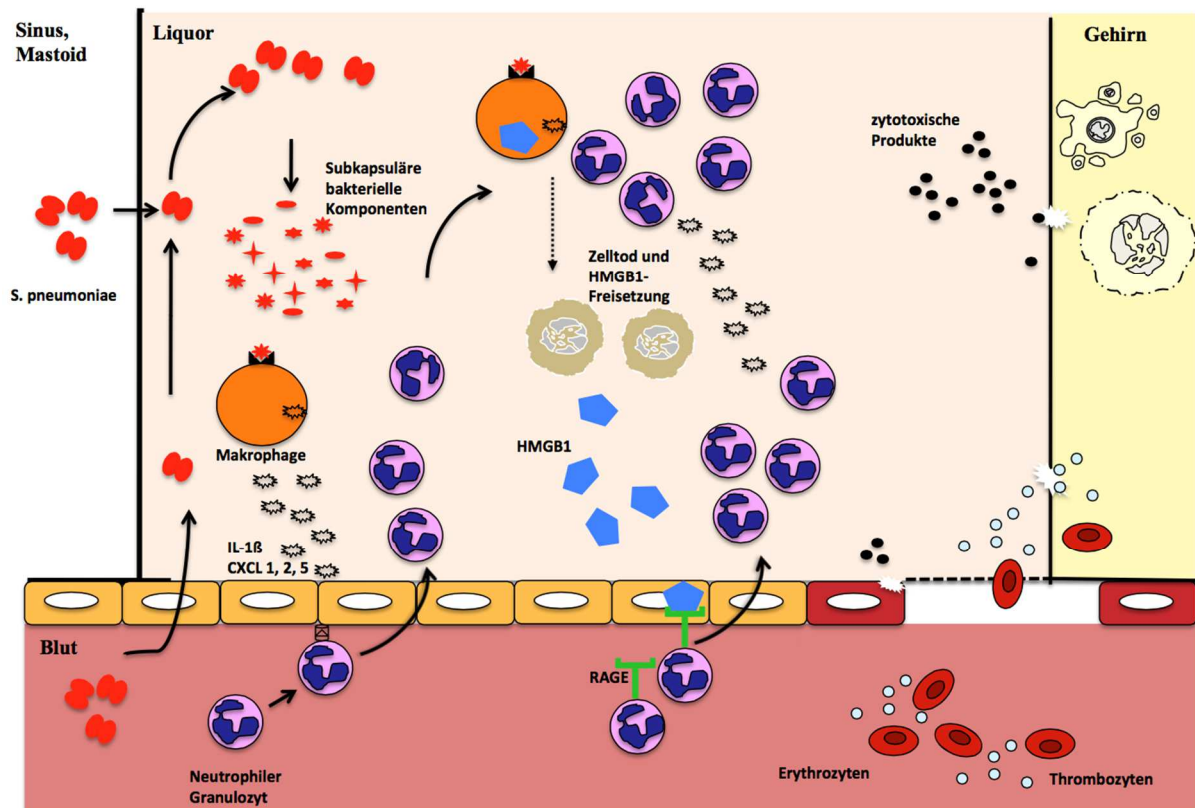


Abbildung 22: Modell der Immunpathogenese der Pneumokokkenmeningitis (modifiziert nach Koedel, U. et al., 2010b)

Sobald *Streptococcus pneumoniae* in den Liquorraum eingedrungen ist, kommt es dort aufgrund der lokalen Infektabwehrschwäche zu einer raschen bakteriellen Vermehrung. Dies basiert in erster Linie auf einem lokalen Mangel an löslichen Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) (Koedel, U. et al., 2010a). Das bakterielle Wachstum führt zur Azidose im Liquor, was wiederum die Autolyse von einigen Bakterien triggert (Pinas, G. E. et al., 2008). Infolgedessen werden Bestandteile der Pneumokokken (PAMPs) in den Liquor freigesetzt. Deren Erkennung durch Mustererkennungsrezeptoren, wie z.B. durch TLR2 und TLR4 (Koedel, U. et al., 2010a), löst eine Entzündungsreaktion aus: Über verschiedene Signalkaskaden kommt es zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (wie IL-1β, CXCL1, 2 und 5). Infolgedessen werden neutrophile Granulozyten in den Liquorraum rekrutiert, die zytotoxische Substanzen freisetzen und Gewebeschäden verursachen können. Die Entzündungsreaktion kann allerdings die Vermehrung der Bakterien nicht verhindern (Ernst, J. D. et al., 1983), die bakterielle Konzentration im Liquor kann daher

Diskussion

hohe Werte (über 10^7 KBE/ml) erreichen; derartige Konzentrationen können auf Wirtszellen zytotoxisch wirken.

Aus geschädigten Zellen wird in der Folge HMGB1 passiv freigesetzt. HMGB1 kann durch Interaktion mit RAGE chemotaktisch auf Leukozyten, wie neutrophile Granulozyten, aus dem Blut wirken. So kann es das granulozytäre Infiltrat verstärken und die Entzündungsreaktion aufrechterhalten. Die große Anzahl an aktivierten Granulozyten produziert große Mengen an zytotoxischen Substanzen, die zu Kollateralschäden am körpereigenen Gewebe führen und so die Meningitis-assoziierten Gewebeschäden verstärken können.

Die Hemmung der Freisetzung von HMGB1 oder der proinflammatorischen Wirkung von HMGB1 könnte ein vielversprechendes Ziel in der adjuvanten Therapie der Pneumokokkenmeningitis darstellen, da die Entzündungsreaktion die Hauptursache für Gewebeschäden darstellt und dadurch entscheidend zu ungünstigen klinischen Verläufen beiträgt.

6 Zusammenfassung

Die Letalität der Pneumokokkenmeningitis ist trotz Antibiotikatherapie, adjuvanter Dexamethasonbehandlung und intensivtherapeutischer Versorgung der Patienten weiterhin inakzeptabel hoch. Hauptverantwortlich für ungünstige klinische Verläufe sind im Krankheitsverlauf auftretende intrakranielle Komplikationen. Die Ursache für die Entwicklung intrakranieller Komplikationen und Hirnschäden wiederum liegt in der massiven, oft protrahiert verlaufenden neutrophilen Entzündungsreaktion. Neben bakteriellen Bestandteilen, sogenannten PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster; *pathogen associated molecular patterns*), können auch endogene Signale, sogenannte DAMPs (Schaden-assoziierte molekulare Muster; *damage associated molecular patterns*) zur Induktion und Aufrechterhaltung einer Immunreaktion beitragen. Zu diesen DAMPs gehört u.a. high mobility group box 1 protein (HMGB1). HMGB1 kann aktiv von Zellen des angeborenen Immunsystems (Andersson, U. und Tracey, K. J., 2011) oder passiv von zu Grunde gehenden Zellen (Bell, C. W. et al., 2006; Scaffidi, P. et al., 2002) in den Extrazellulärraum freigesetzt werden und dort proinflammatorische Wirkung entfalten. Als zentrale Rezeptoren für extrazelluläres HMGB1 wurden bisher TLR2, TLR4 und RAGE beschrieben (Hori, O. et al., 1995; Park, J. S. et al., 2004; van Zoelen, M. A. et al., 2009b; Yu, M. et al., 2006).

In zwei kleinen Fallstudien wurde von erhöhten HMGB1-Konzentrationen im Liquor von Kindern mit einer bakteriellen Meningitis berichtet (Asano, T. et al., 2011; Tang, D. et al., 2008). Die Rolle von HMGB1 bei der Pneumokokkenmeningitis des Erwachsenen war jedoch bislang unklar. Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es, den Mechanismus der Freisetzung von HMGB1 bei der Pneumokokkenmeningitis sowie dessen funktionelle Relevanz für die Entwicklung und das Fortschreiten dieser Erkrankung zu ergründen.

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde ein gut etabliertes Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis verwendet (Koedel, U. et al., 2009a; Woehrl, B. et al., 2011). Zunächst wurden die Tiere einer klinischen Eingangsuntersuchung unterzogen. Dabei wurden Gewicht und Körpertemperatur gemessen und anschließend die motorische Aktivität bestimmt. Zur Beurteilung des klinischen Status wurde ein modifiziertes Punktesystem eingesetzt (Garcia, J. H. et al., 1995) und so ein klinischer Score ermittelt (siehe Tabelle 1). Dieser Score beinhaltet die Fähigkeit der Tiere, auf einem Balken zu balancieren, die Beurteilung der posturalen Reflexe, die Begutachtung der Vigilanz, das Auftreten von

Zusammenfassung

epileptischen Anfällen und das Vorhandensein einer Piloerektion. Bei gesunden Tieren beträgt der Score 0 Punkte, maximal können 12 Punkte erreicht werden. Mäuse mit 11 oder mehr Punkten wurden als terminal krank angesehen und aus ethischen Gründen euthanasiert. Anschließend wurden die Tiere unter einer Isofluran-Kurzzealnarkose durch die transkutane Injektion von *S. pneumoniae* in die *Cisterna magna* infiziert. Bei Versuchsende wurden die Tiere erneut klinisch evaluiert und im Anschluss durch die intraperitoneale Gabe von Ketamin/Xylazin narkotisiert und zur Vorbereitung der Präparation in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Nach einer Lokalanästhesie mit Lidocain wurde das *Os parietale und interparietale* freipräpariert und in Verlängerung der *Sutura sagittalis* im posterioren Anteil des *Os interparietale* ein Bohrloch angelegt. Durch dieses wurde ein Katheter in die *Cisterna magna* eingeführt und Liquor entnommen. Der Liquor wurde zur Zellzahlbestimmung der Leukozyten herangezogen; restlicher Liquor wurde für weitere Untersuchungen zentrifugiert und der Überstand weggefroren. Anschließend wurde mittels eines Druckwandlers über einen in der *Cisterna magna* liegenden Katheter der intrakranielle Druck gemessen. Zuletzt wurden die Tiere tief narkotisiert, anschließend thorakotomiert und aus dem rechten Herzventrikel Blut entnommen. Danach wurde das Gefäßsystem der Tiere transkardial mit eisgekühlter, heparinierter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung perfundiert. Daraufhin wurden die Gehirne entnommen und das Kleinhirn abgetrennt. Die Großhirne wurden umgehend bei -80 °C tiefgefroren und später zur Quantifizierung von Einblutungen, für immunhistochemische Untersuchungen und für Analysen mittels ELISA verwendet. Die Kleinhirne wurden homogenisiert und zur Bestimmung der bakteriellen Titer im Hirngewebe eingesetzt.

Mittels Western Blot-Analysen konnte HMGB1 in großen Mengen im Liquor von Patienten und Mäusen mit einer Pneumokokkenmeningitis nachgewiesen werden. Bei Mäusen waren die Konzentrationen von HMGB1 im Liquor in fortgeschrittenen Krankheitsstadien höher als in der Frühphase der Erkrankung.

Die funktionelle Relevanz von HMGB1 bei der Pneumokokkenmeningitis wurde in Untersuchungen am Mausmodell deutlich. Um den Einfluss von HMGB1 auf die Entwicklung einer Meningitis zu untersuchen, erfolgte unmittelbar nach Infektion der Mäuse eine intraperitoneale Behandlung mit den HMGB1-Antagonisten Ethylpyruvat oder rekombinantem Box A Protein; 24 Stunden später wurden die Tiere evaluiert. Um den Effekt von HMGB1 im fortgeschrittenen Stadium einer Pneumokokkenmeningitis zu untersuchen, wurden Tiere 21 Stunden nach der Infektion antibiotisch mit Ceftriaxon und adjuvant mit den

oben genannten HMGB1-Antagonisten behandelt. Die Evaluation erfolgte abermals 24 Stunden später (also 45 Stunden *post infectionem*). Eine Behandlung mit den HMGB1-Antagonisten Ethylpyruvat und rekombinantem Box A Protein konnte dabei die Entstehung einer Meningitis nicht verhindern, führte aber bei gleichzeitiger adjuvanter Gabe während einer antibiotischen Therapie zur besseren Resolution der Entzündung und damit einhergehend zur Reduktion der pathologischen Veränderungen im Gehirn und zu einem besseren klinischen Zustand der Tiere zum Versuchsendpunkt.

Diese Beobachtungen ließen sich anhand von *in vitro*-Untersuchungen auf einen chemotaktischen Effekt von HMGB1 auf neutrophile Granulozyten zurückführen: In Migrationsuntersuchungen mit einer Mikrochemotaxie-Kammer wirkte rekombinantes HMGB1 direkt chemotaktisch auf murine Hoxb8-Neutrophile und Knochenmarks-Granulozyten. Dabei war der chemotaktische Effekt abhängig von RAGE: Eine Vorbehandlung der Neutrophilen mit einem RAGE-blockierenden Antikörper (nicht aber mit dessen Isotyp-Kontroll-Antikörper) verringerte die Leukozytenmigration signifikant. Zudem wirkte HMGB1 zwar chemotaktisch auf Neutrophile von Wildtyp-Mäusen, nicht aber auf Neutrophile RAGE-defizienter Mäuse.

Der chemotaktische Effekt war in *in vivo*-Untersuchungen am Mausmodell reproduzierbar: Injizierte man Mäusen rekombinantes HMGB1 in die *Cisterna magna*, so führte dies innerhalb von 6 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Leukozyten im Liquor, im Vergleich mit Mäusen, denen entweder Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung oder Hitze-inaktiviertes HMGB1 intrazisternal appliziert worden war.

Zur Untersuchung der dabei beteiligten Rezeptoren wurde rekombinantes HMGB1 nun TLR2-TLR4-doppel-defizienten und RAGE-defizienten Mäusen intrazisternal injiziert. In Analogie zu unseren *in vitro*-Beobachtungen in der Mikrochemotaxie-Kammer ging dabei die RAGE-Gendefizienz (nicht aber die Doppeldefizienz von TLR2 und TLR4) mit einer signifikanten Reduktion der HMGB1-induzierten Liquorpleozytose einher.

RAGE ließ sich immunhistochemisch verstärkt in Gefäßwänden und im entzündlichen Infiltrat von infizierten Mäusen nachweisen. Die funktionelle Bedeutung von RAGE bestätigte sich anhand weiterer Untersuchungen an RAGE-defizienten Mäusen: Die RAGE-Defizienz hatte keine Auswirkung auf die Entstehung einer Meningitis. Dagegen fanden wir signifikant weniger Leukozyten im Liquor von RAGE-defizienten Mäusen als bei Wildtyp-

Zusammenfassung

Mäusen, wenn die Tiere 21 Stunden nach Infektion bei einer bestehenden Meningitis antibiotisch therapiert und weitere 24 Stunden später evaluiert wurden; die Reduktion der Liquorpleozytose ging zudem mit einem mildereren Krankheitsverlauf einher. Eine zusätzliche Behandlung der RAGE-defizienten Tiere mit Ethylpyruvat hatte keinen Effekt auf die Liquorpleozytose und den klinischen Status der Mäuse.

Zur Untersuchung des Freisetzungsmechanismus von HMGB1 wurden murine J774.2-Makrophagen mit Hitze-abgetöteten Pneumokokken (HKPs) stimuliert. Dabei zeigte sich in Western Blot-Analysen eine Freisetzung von HMGB1, die abhängig von der Bakterienkonzentration und von der Stimulationsdauer war. Die HMGB1-Freisetzung korrelierte zudem positiv mit dem Zelltod, der durch Messung der Laktatdehydrogenase im Zellkultur-Überstand quantifiziert wurde.

Ein kürzlich publizierter von Inflammasom- und Caspase-1-abhängiger Mechanismus der HMGB1-Freisetzung (Lamkanfi, M. et al., 2010; Lu, B. et al., 2012) konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit nicht bestätigt werden: So konnte die HMGB1-Freisetzung aus stimulierten J774.2-Makrophagen weder durch den Einsatz des Inflammasom-Hemmstoffes z-YVAD-fmk, des P2X7-Purinrezeptor-Antagonisten A438079 noch durch eine erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration gehemmt werden. Ebenso fanden wir vergleichbare HMGB1-Konzentrationen im Überstand von Knochenmarks-Makrophagen von Wildtyp- und ASC (einem Inflammasom-Adapter)-defizienten Mäusen nach einer Pneumokokken-Stimulation.

Einen alternativen Mechanismus, der zur HMGB1-Freisetzung führen kann, stellt oxidativer Stress dar: Makrophagen sind in der Lage, nach Stimulation durch Pneumokokken reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freizusetzen (Koedel, U. und Pfister, H. W., 1999); diese können Zelltod und die Freisetzung von HMGB1 induzieren (Loukili, N. et al., 2011; Tang, D. et al., 2007). In unseren Zellkulturexperimenten war der Einsatz verschiedener Antioxidantien (DPI, NAC und MnTBAP) bei Pneumokokken-exponierten J774.2-Makrophagen wirkungslos.

Damit konnten wir zeigen, dass die HMGB1-Freisetzung bei einer Pneumokokkenmeningitis unabhängig vom Inflammasom und von ROS erfolgt.

Zusammengefasst zeigt diese Promotionsarbeit, dass das endogene Alarmsignal HMGB1, das vorwiegend passiv aus sterbenden Zellen freigesetzt wird, eine zentrale Rolle in der Entzündungskaskade einer Pneumokokkenmeningitis einnimmt. Da diese entzündliche

Zusammenfassung

Reaktion zur Entwicklung Meningitis-assoziierten Hirnschäden beiträgt, könnte HMGB1 ein vielversprechendes Ziel der adjuvanten Therapie dieser Erkrankung darstellen.

7 Ausblick

Die Untersuchungen dieser Promotionsarbeit zeigten, dass der pharmakologische Einsatz von HMGB1-Antagonisten wie Ethylpyruvat und rekombinantem Box A Protein, wenn sie gemeinsam mit einem wirksamen Antibiotikum verabreicht werden, den akuten Krankheitsverlauf einer Pneumokokkenmeningitis signifikant verbessern kann. Diese Beobachtung lässt weitere Fragestellungen zu:

[i] Es gilt zu untersuchen, ob eine adjuvante Behandlung mit HMGB1-Antagonisten auch dann noch protektiv wirkt, wenn sie nach Beginn der Antibiotikatherapie eingeleitet wird. Es sollte/muss ein „therapeutisches Fenster“ definiert werden, also der Zeitraum nach Beginn der Antibiotikatherapie festgestellt werden, in dem die adjuvante Behandlung noch wirksam ist.

[ii] Derzeit ist Dexamethason das Mittel der Wahl bei der adjuvanten Behandlung der Pneumokokkenmeningitis und hat als solches in den therapeutischen Leitlinien Aufnahme gefunden (siehe Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012; <http://www.dgn.org/leitlinien.html>). Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, welchen Effekt die gleichzeitige Gabe von Dexamethason auf die protektive Wirkung der HMGB1-Antagonisten hat. Die Beantwortung dieser Frage ist, bei dem aktuellen Stellenwert von Dexamethason in der adjuvanten Therapie der Pneumokokkenmeningitis, Grundvoraussetzung für eine mögliche Translation eines auf die Hemmung von HMGB1 ausgerichteten Behandlungsansatzes in die klinische Praxis.

[iii] In dieser Arbeit wurden keine Meningitis-induzierten Langzeit-Folgeschäden untersucht. Ziel zukünftiger Studien sollte daher auch die Klärung der Frage sein, ob durch den adjuvanten Einsatz von HMGB1-Antagonisten auch die Entwicklung von Langzeit-Folgeschäden, insbesondere von Hörschäden und Gedächtnisstörungen, günstig beeinflusst oder sogar verhindert werden kann.

[iv] In dieser Studie wurden Liquorproben von lediglich 4 Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis untersucht. In einer weiterführenden Studie sollten daher ein größeres Kollektiv von Patienten mit einer Pneumokokkenmeningitis untersucht sowie Korrelationen zwischen den HMGB1-Liquorspiegeln und klinischen Parametern ermittelt werden. Hieraus könnten wichtige Erkenntnisse über einen möglichen Einsatz von HMGB1 als klinischen Verlaufsparemeter bei der Pneumokokkenmeningitis gewonnen werden.

8 Literaturverzeichnis

- Abraham, E., Arcaroli, J., Carmody, A., Wang, H. und Tracey, K. J. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000; 165: 2950-4
- Agnello, D., Wang, H., Yang, H., Tracey, K. J. und Ghezzi, P. HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. *Cytokine* 2002; 18: 231-6
- Andersson, U. und Tracey, K. J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 139-62
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A. C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H. und Tracey, K. J. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 565-70
- Asano, T., Ichiki, K., Koizumi, S., Kaizu, K., Hatori, T., Mashiko, K., Sakamoto, Y., Miyasho, T., Fujino, O. und Fukunaga, Y. High mobility group box 1 in cerebrospinal fluid from several neurological diseases at early time points. *Int J Neurosci* 2011; 121: 480-4
- Austrian, R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Reviews of infectious diseases* 1981; 3 Suppl: S1-17
- Banerjee, S., Friggeri, A., Liu, G. und Abraham, E. The C-terminal acidic tail is responsible for the inhibitory effects of HMGB1 on efferocytosis. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 973-9
- Barichello, T., Generoso, J. S., Collodel, A., Moreira, A. P. und Almeida, S. M. Pathophysiology of acute meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and adjunctive therapy approaches. *Arquivos de neuro-psiquiatria* 2012; 70: 366-72
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M. und Srivastava, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12: 1539-46
- Beigi, R. D., Kertesz, S. B., Aquilina, G. und Dubyak, G. R. Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 507-19
- Bell, C. W., Jiang, W., Reich, C. F., 3rd und Pisetsky, D. S. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291: C1318-25
- Berthelot, F., Fattoum, L., Casulli, S., Gozlan, J., Marechal, V. und Elbim, C. The effect of HMGB1, a damage-associated molecular pattern molecule, on polymorphonuclear neutrophil migration depends on its concentration. *J Innate Immun* 2012; 4: 41-58
- Beutler, B. A. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; 113: 1399-407

- Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5
- Bianchi, M. E. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 573-6
- Blatt, C., Aberdam, D., Schwartz, R. und Sachs, L. DNA rearrangement of a homeobox gene in myeloid leukaemic cells. *EMBO J* 1988; 7: 4283-90
- Blazer, S., Berant, M. und Alon, U. Bacterial meningitis. Effect of antibiotic treatment on cerebrospinal fluid. *American journal of clinical pathology* 1983; 80: 386-7
- Bogaert, D., Engelen, M. N., Timmers-Reker, A. J., Elzenaar, K. P., Peerbooms, P. G., Coutinho, R. A., de Groot, R. und Hermans, P. W. Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3316-20
- Brouwer, M. C., McIntyre, P., Prasad, K. und van de Beek, D. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 6: Cd004405
- Bustin, M. At the crossroads of necrosis and apoptosis: signaling to multiple cellular targets by HMGB1. *Sci STKE* 2002; 2002: pe39
- Bustin, M., Lehn, D. A. und Landsman, D. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1049: 231-43
- Cairns, H. und Russell, D. S. Cerebral arteritis and phlebitis in pneumococcal meningitis. *J Pathol Bacteriol* 1946; 58: 649-65
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S. und Bianchi, M. E. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nature genetics* 1999; 22: 276-80
- Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y. G. und Nunez, G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 365-98
- Chen, G., Ward, M. F., Sama, A. E. und Wang, H. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24: 329-33
- Chen, H. B., Lin, Y. H. und Sun, S. H. Oxidized ATP decreases beta-actin expression and intracellular superoxide concentrations in RBA-2 type-2 astrocytes independently of P2X7 receptor. *European journal of pharmacology* 2006; 550: 1-7
- Chinnery, H. R., Ruitenberg, M. J. und McMenamin, P. G. Novel characterization of monocyte-derived cell populations in the meninges and choroid plexus and their rates of replenishment in bone marrow chimeric mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69: 896-909
- Cowan, M. J., Ammann, A. J., Wara, D. W., Howie, V. M., Schultz, L., Doyle, N. und Kaplan, M. Pneumococcal polysaccharide immunization in infants and children. *Pediatrics* 1978; 62: 721-7
- Dawson, K. G., Emerson, J. C. und Burns, J. L. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 816-22

- de Gans, J. und van de Beek, D. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2002; 347: 1549-56
- de Graaf, M. T., Smitt, P. A., Luitwieler, R. L., van Velzen, C., van den Broek, P. D., Kraan, J. und Gratama, J. W. Central memory CD4⁺ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry B Clin Cytom* 2011; 80: 43-50
- Del Bigio, M. R. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 1995; 14: 1-13
- Di Virgilio, F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends in pharmacological sciences* 2007; 28: 465-72
- Dinarello, C. A. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-8
- Dodge, P. R. und Swartz, M. N. Bacterial meningitis—a review of selected aspects. II. special neurologic problems, postmeningitic complications and clinicopathological correlations. *N Engl J Med* 1965; 272: 1003-10 CONCL
- Dubyak, G. R. P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cellular microbiology* 2012; 14: 1697-706
- Dujardin, B. C., Driedijk, P. C., Roijers, A. F. und Out, T. A. The determination of the complement components C1q, C4 and C3 in serum and cerebrospinal fluid by radioimmunoassay. *J Immunol Methods* 1985; 80: 227-37
- Dumitriu, I. E., Baruah, P., Manfredi, A. A., Bianchi, M. E. und Rovere-Querini, P. HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol* 2005a; 26: 381-7
- Dumitriu, I. E., Baruah, P., Valentinis, B., Voll, R. E., Herrmann, M., Nawroth, P. P., Arnold, B., Bianchi, M. E., Manfredi, A. A. und Rovere-Querini, P. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 2005b; 174: 7506-15
- Dumitriu, I. E., Bianchi, M. E., Bacci, M., Manfredi, A. A. und Rovere-Querini, P. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 84-91
- Entezari, M., Weiss, D. J., Sitapara, R., Whittaker, L., Wargo, M. J., Li, J., Wang, H., Yang, H., Sharma, L., Phan, B. D., Javdan, M., Chavan, S. S., Miller, E. J., Tracey, K. J. und Mantell, L. L. Inhibition of high-mobility group box 1 protein (HMGB1) enhances bacterial clearance and protects against *Pseudomonas Aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 2012; 18: 477-85
- Ernst, J. D., Decazes, J. M. und Sande, M. A. Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes in pathogenesis. *Infect Immun* 1983; 41: 275-9
- Feng, Y., Yang, Q., Xu, J., Qian, G. und Liu, Y. Effects of HMGB1 on PMN apoptosis during LPS-induced acute lung injury. *Exp Mol Pathol* 2008; 85: 214-22
- Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J. W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J. und Alnemri, E. S. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers

mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1590-604

Ferrari, S., Finelli, P., Rocchi, M. und Bianchi, M. E. The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13. *Genomics* 1996; 35: 367-71

Fischer, H. und Tomasz, A. Production and release of peptidoglycan and wall teichoic acid polymers in pneumococci treated with beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol* 1984; 157: 507-13

Fishman, R. A. Brain edema. *N Engl J Med* 1975; 293: 706-11

Fiuza, C., Bustin, M., Talwar, S., Tropea, M., Gerstenberger, E., Shelhamer, J. H. und Suffredini, A. F. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003; 101: 2652-60

Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T. und Roth, J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 28-37

Franchi, L., Eigenbrod, T., Munoz-Planillo, R. und Nunez, G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; 10: 241-7

Friggeri, A., Yang, Y., Banerjee, S., Park, Y. J., Liu, G. und Abraham, E. HMGB1 inhibits macrophage activity in efferocytosis through binding to the alphavbeta3-integrin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C1267-76

Gallucci, S., Lolkema, M. und Matzinger, P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5: 1249-55

Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F. und Hu, X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995; 26: 627-34; discussion 635

Gehrmann, J., Matsumoto, Y. und Kreutzberg, G. W. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 20: 269-87

Gerber, J. und Nau, R. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Current opinion in neurology* 2010; 23: 312-8

Gerber, J., Pohl, K., Sander, V., Bunkowski, S. und Nau, R. Rifampin followed by ceftriaxone for experimental meningitis decreases lipoteichoic acid concentrations in cerebrospinal fluid and reduces neuronal damage in comparison to ceftriaxone alone. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003; 47: 1313-7

Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. und Sansonetti, P. J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278: 8869-72

- Gloor, S. M., Wachtel, M., Bolliger, M. F., Ishihara, H., Landmann, R. und Frei, K. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 36: 258-64
- Gong, Q., Xu, J. F., Yin, H., Liu, S. F., Duan, L. H. und Bian, Z. L. Protective effect of antagonist of high-mobility group box 1 on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Scand J Immunol* 2009; 69: 29-35
- Grandgirard, D., Oberson, K., Buhlmann, A., Gaumann, R. und Leib, S. L. Attenuation of cerebrospinal fluid inflammation by the nonbacteriolytic antibiotic daptomycin versus that by ceftriaxone in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; 54: 1323-6
- Hardman, C. H., Broadhurst, R. W., Raine, A. R., Grasser, K. D., Thomas, J. O. und Laue, E. D. Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1995; 34: 16596-607
- Harris, H. E. und Raucchi, A. Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep* 2006; 7: 774-8
- Hatada, E. N., Krappmann, D. und Scheidereit, C. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 52-8
- Hirst, R. A., Kadioglu, A., O'Callaghan, C. und Andrew, P. W. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clinical and experimental immunology* 2004; 138: 195-201
- Hoegen, T., Tremel, N., Klein, M., Angele, B., Wagner, H., Kirschning, C., Pfister, H. W., Fontana, A., Hammerschmidt, S. und Koedel, U. The NLRP3 Inflammasome Contributes to Brain Injury in Pneumococcal Meningitis and Is Activated through ATP-Dependent Lysosomal Cathepsin B Release. *J Immunol* 2011; 187: 5440-51
- Hoffmann, O., Priller, J., Prozorovski, T., Schulze-Topphoff, U., Baeva, N., Lunemann, J. D., Aktas, O., Mahrhofer, C., Stricker, S., Zipp, F. und Weber, J. R. TRAIL limits excessive host immune responses in bacterial meningitis. *J Clin Invest* 2007; 117: 2004-13
- Hori, O., Brett, J., Slaterry, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J. X., Nagashima, M., Lundh, E. R., Vijay, S., Nitecki, D. und et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 1995; 270: 25752-61
- Hsu, H. E., Shutt, K. A., Moore, M. R., Beall, B. W., Bennett, N. M., Craig, A. S., Farley, M. M., Jorgensen, J. H., Lexau, C. A., Petit, S., Reingold, A., Schaffner, W., Thomas, A., Whitney, C. G. und Harrison, L. H. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med* 2009; 360: 244-56
- Hussein, A. S. und Shafran, S. D. Acute bacterial meningitis in adults. A 12-year review. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 360-8

- Ishii, K. J., Suzuki, K., Coban, C., Takeshita, F., Itoh, Y., Matoba, H., Kohn, L. D. und Klinman, D. M. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* 2001; 167: 2602-7
- Ivanov, S., Dragoi, A. M., Wang, X., Dallacosta, C., Louten, J., Musco, G., Sitia, G., Yap, G. S., Wan, Y., Biron, C. A., Bianchi, M. E., Wang, H. und Chu, W. M. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 2007; 110: 1970-81
- Janeway, C., eds. *Immunobiology: The Immune System In Health And Disease*. 6th ed. New York : Garland Science, 2005. Print. 2005;
- Janoff, E. N., Fasching, C., Orenstein, J. M., Rubins, J. B., Opstad, N. L. und Dalmasso, A. P. Killing of *Streptococcus pneumoniae* by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes. *J Clin Invest* 1999; 104: 1139-47
- Jiang, W. und Pisetsky, D. S. The role of IFN- α and nitric oxide in the release of HMGB1 by RAW 264.7 cells stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid or lipopolysaccharide. *J Immunol* 2006; 177: 3337-43
- Jit, M. The risk of sequelae due to pneumococcal meningitis in high-income countries: a systematic review and meta-analysis. *J Infect* 2010; 61: 114-24
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. und Andrew, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 288-301
- Kaetzel, C. S. Polymeric Ig receptor: defender of the fort or Trojan horse? *Current biology : CB* 2001; 11: R35-8
- Kanegaye, J. T., Soliemanzadeh, P. und Bradley, J. S. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. *Pediatrics* 2001; 108: 1169-74
- Kastenbauer, S. und Pfister, H. W. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* 2003; 126: 1015-25
- Kellner, J. D. und Ford-Jones, E. L. *Streptococcus pneumoniae* carriage in children attending 59 Canadian child care centers. Toronto Child Care Centre Study Group. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 1999; 153: 495-502
- Kim, K. S. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 376-85
- Kim, Y. S., Kennedy, S. und Tauber, M. G. Toxicity of *Streptococcus pneumoniae* in neurons, astrocytes, and microglia in vitro. *J Infect Dis* 1995; 171: 1363-8
- Klein, M., Koedel, U., Pfefferkorn, T., Zeller, G., Woehrl, B. und Pfister, H. W. Arterial cerebrovascular complications in 94 adults with acute bacterial meningitis. *Critical care (London, England)* 2011; 15: R281
- Klein, M., Koedel, U. und Pfister, H. W. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol* 2006; 80: 269-80

- Klein, M., Obermaier, B., Angele, B., Pfister, H. W., Wagner, H., Koedel, U. und Kirschning, C. J. Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Infect Dis* 2008; 198: 1028-36
- Kniesel, U. und Wolburg, H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cellular and molecular neurobiology* 2000; 20: 57-76
- Knoepfler, P. S., Sykes, D. B., Pasillas, M. und Kamps, M. P. HoxB8 requires its Pbx-interaction motif to block differentiation of primary myeloid progenitors and of most cell line models of myeloid differentiation. *Oncogene* 2001; 20: 5440-8
- Koedel, U., Frankenberg, T., Kirschnek, S., Obermaier, B., Hacker, H., Paul, R. und Hacker, G. Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog* 2009a; 5: e1000461
- Koedel, U., Klein, M. und Pfister, H. W. Akute bakterielle Meningitis: Neues aus Forschung und Klinik. *Akt Neurol* 2009b; 36: 381,396
- Koedel, U., Klein, M. und Pfister, H. W. Modulation of brain injury as a target of adjunctive therapy in bacterial meningitis. *Curr Infect Dis Rep* 2010a; 12: 266-73
- Koedel, U., Klein, M. und Pfister, H. W. New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 2010b;
- Koedel, U., Kohleisen, B., Sporer, B., Lahrtz, F., Ovod, V., Fontana, A., Erfle, V. und Pfister, H. W. HIV type 1 Nef protein is a viral factor for leukocyte recruitment into the central nervous system. *J Immunol* 1999; 163: 1237-45
- Koedel, U., Paul, R., Winkler, F., Kastenbauer, S., Huang, P. L. und Pfister, H. W. Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 1041-50
- Koedel, U. und Pfister, H. W. Protective effect of the antioxidant N-acetyl-L-cysteine in pneumococcal meningitis in the rat. *Neurosci Lett* 1997; 225: 33-6
- Koedel, U. und Pfister, H. W. Superoxide production by primary rat cerebral endothelial cells in response to pneumococci. *J Neuroimmunol* 1999; 96: 190-200
- Koedel, U., Pfister, H. W. und Tomasz, A. Methylprednisolone attenuates inflammation, increase of brain water content and intracranial pressure, but does not influence cerebral blood flow changes in experimental pneumococcal meningitis. *Brain Res* 1994; 644: 25-31
- Koedel, U., Rupprecht, T., Angele, B., Heesemann, J., Wagner, H., Pfister, H. W. und Kirschning, C. J. MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain* 2004; 127: 1437-45
- Koedel, U., Scheld, W. M. und Pfister, H. W. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2002a; 2: 721-36
- Koedel, U., Winkler, F., Angele, B., Fontana, A., Flavell, R. A. und Pfister, H. W. Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice. *Ann Neurol* 2002b; 51: 319-29

- Kokkola, R., Andersson, A., Mullins, G., Ostberg, T., Treutiger, C. J., Arnold, B., Nawroth, P., Andersson, U., Harris, R. A. und Harris, H. E. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol* 2005; 61: 1-9
- Kono, H. und Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279-89
- Lamkanfi, M. und Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014; 157: 1013-22
- Lamkanfi, M., Sarkar, A., Vande Walle, L., Vitari, A. C., Amer, A. O., Wewers, M. D., Tracey, K. J., Kanneganti, T. D. und Dixit, V. M. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol* 2010; 185: 4385-92
- Ledeboer, A., Breve, J. J., Poole, S., Tilders, F. J. und Van Dam, A. M. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* 2000; 30: 134-42
- Lewis, K. Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 503-14
- Li, J. Y., Boado, R. J. und Pardridge, W. M. Blood-brain barrier genomics. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 61-8
- Liu, G., Wang, J., Park, Y. J., Tsuruta, Y., Lorne, E. F., Zhao, X. und Abraham, E. High mobility group protein-1 inhibits phagocytosis of apoptotic neutrophils through binding to phosphatidylserine. *J Immunol* 2008; 181: 4240-6
- Liu, K., Mori, S., Takahashi, H. K., Tomono, Y., Wake, H., Kanke, T., Sato, Y., Hiraga, N., Adachi, N., Yoshino, T. und Nishibori, M. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* 2007; 21: 3904-16
- Liu, X., Chauhan, V. S., Young, A. B. und Marriott, I. NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia* 2010; 58: 839-47
- Lotze, M. T. und Tracey, K. J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 331-42
- Loukili, N., Rosenblatt-Velin, N., Li, J., Clerc, S., Pacher, P., Feihl, F., Waeber, B. und Liaudet, L. Peroxynitrite induces HMGB1 release by cardiac cells in vitro and HMGB1 upregulation in the infarcted myocardium in vivo. *Cardiovascular research* 2011; 89: 586-94
- Lu, B., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundback, P., Valdes-Ferrer, S. I., Olofsson, P. S., Kalb, T., Roth, J., Zou, Y., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., Ting, J. P., Wang, H., Andersson, U., Antoine, D. J., Chavan, S. S., Hotamisligil, G. S. und Tracey, K. J. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 2012; 488: 670-4
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S. C., Cieslewicz, M. J., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Kurt-Jones, E., Paton, J. C., Wessels, M. R. und Golenbock, D. T. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1966-71

- Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Aronica, E., Iyer, A. M., Rossetti, C., Molteni, M., Casalgrandi, M., Manfredi, A. A., Bianchi, M. E. und Vezzani, A. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med* 2010; 16: 413-9
- Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-5
- Matzinger, P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol* 2007; 8: 11-3
- Mazarati, A., Maroso, M., Iori, V., Vezzani, A. und Carli, M. High-mobility group box-1 impairs memory in mice through both toll-like receptor 4 and Receptor for Advanced Glycation End Products. *Exp Neurol* 2011; 232: 143-8
- Moayeri, M., Wickliffe, K. E., Wiggins, J. F. und Leppla, S. H. Oxidized ATP protection against anthrax lethal toxin. *Infect Immun* 2006; 74: 3707-14
- Mogensen, T. H., Paludan, S. R., Kilian, M. und Ostergaard, L. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 267-77
- Moller, K., Qvist, T., Tofteng, F., Sahl, C., Sonderkaer, S., Dethloff, T., Knudsen, G. M. und Larsen, F. S. Cerebral blood flow and metabolism during infusion of norepinephrine and propofol in patients with bacterial meningitis. *Stroke* 2004; 35: 1333-9
- Mook-Kanamori, B. B., Geldhoff, M., van der Poll, T. und van de Beek, D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 557-91
- Morona, J. K., Paton, J. C., Miller, D. C. und Morona, R. Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 2000; 35: 1431-42
- Moscato, M. und Claverys, J. P. Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol* 2004; 54: 783-94
- Muhammad, S., Barakat, W., Stoyanov, S., Murikinati, S., Yang, H., Tracey, K. J., Bendszus, M., Rossetti, G., Nawroth, P. P., Bierhaus, A. und Schwaninger, M. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J Neurosci* 2008; 28: 12023-31
- Musher, D. M. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1992; 14: 801-7
- Nau, R. und Bruck, W. Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 2002; 25: 38-45
- Ni, H., Capodici, J., Cannon, G., Communi, D., Boeynaems, J. M., Kariko, K. und Weissman, D. Extracellular mRNA induces dendritic cell activation by stimulating tumor necrosis factor- α secretion and signaling through a nucleotide receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 12689-96

- Nieder Korn, J. Y. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat Immunol* 2006; 7: 354-9
- Nuorti, J. P., Butler, J. C., Crutcher, J. M., Guevara, R., Welch, D., Holder, P. und Elliott, J. A. An outbreak of multidrug-resistant pneumococcal pneumonia and bacteremia among unvaccinated nursing home residents. *N Engl J Med* 1998; 338: 1861-8
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A. C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R. R., Suttorp, N. und Hippenstiel, S. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 2004; 279: 36426-32
- Orlova, V. V., Choi, E. Y., Xie, C., Chavakis, E., Bierhaus, A., Ihanus, E., Ballantyne, C. M., Gahmberg, C. G., Bianchi, M. E., Nawroth, P. P. und Chavakis, T. A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J* 2007; 26: 1129-39
- Ostergaard, C., Konradsen, H. B. und Samuelsson, S. Clinical presentation and prognostic factors of *Streptococcus pneumoniae* meningitis according to the focus of infection. *BMC infectious diseases* 2005; 5: 93
- Pachter, J. S., de Vries, H. E. und Fabry, Z. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 593-604
- Pardridge, W. M. Blood-brain barrier biology and methodology. *Journal of neurovirology* 1999; 5: 556-69
- Park, J. S., Arcaroli, J., Yum, H. K., Yang, H., Wang, H., Yang, K. Y., Choe, K. H., Strassheim, D., Pitts, T. M., Tracey, K. J. und Abraham, E. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C870-9
- Park, J. S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., Kim, J. Y., Strassheim, D., Sohn, J. W., Yamada, S., Maruyama, I., Banerjee, A., Ishizaka, A. und Abraham, E. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C917-24
- Park, J. S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J. Y., Strassheim, D., Ishizaka, A. und Abraham, E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 7370-7
- Paterson, G. K. und Mitchell, T. J. Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology (Reading, England)* 2006; 152: 285-93
- Paulson, O. B., Brodersen, P., Hansen, E. L. und Kristensen, H. S. Regional cerebral blood flow, cerebral metabolic rate of oxygen, and cerebrospinal fluid acid-base variables in patients with acute meningitis and with acute encephalitis. *Acta Med Scand* 1974; 196: 191-8
- Pedrazzi, M., Patrone, M., Passalacqua, M., Ranzato, E., Colamassaro, D., Sparatore, B., Pontremoli, S. und Melloni, E. Selective proinflammatory activation of astrocytes by high-mobility group box 1 protein signaling. *J Immunol* 2007; 179: 8525-32

- Penzo, M., Molteni, R., Suda, T., Samaniego, S., Raucci, A., Habel, D. M., Miller, F., Jiang, H. P., Li, J., Pardi, R., Palumbo, R., Olivotto, E., Kew, R. R., Bianchi, M. E. und Marcu, K. B. Inhibitor of NF-kappa B kinases alpha and beta are both essential for high mobility group box 1-mediated chemotaxis [corrected]. *J Immunol* 2010; 184: 4497-509
- Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F. und Tschopp, J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1583-9
- Pfister, H. W., Borasio, G. D., Dirnagl, U., Bauer, M. und Einhaupl, K. M. Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults. *Neurology* 1992; 42: 1497-504
- Pfister, H. W., Feiden, W. und Einhaupl, K. M. Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol* 1993; 50: 575-81
- Pinas, G. E., Cortes, P. R., Orio, A. G. und Echenique, J. Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology (Reading, England)* 2008; 154: 1300-8
- Quagliarello, V. und Scheld, W. M. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* 1992; 327: 864-72
- Ralph, P., Prichard, J. und Cohn, M. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. *J Immunol* 1975; 114: 898-905
- Ramakrishnan, M., Ulland, A. J., Steinhardt, L. C., Moisi, J. C., Were, F. und Levine, O. S. Sequelae due to bacterial meningitis among African children: a systematic literature review. *BMC Med* 2009; 7: 47
- Ramesh, G., MacLean, A. G. und Philipp, M. T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 480739
- Reinholdt, J. und Kilian, M. Comparative analysis of immunoglobulin A1 protease activity among bacteria representing different genera, species, and strains. *Infect Immun* 1997; 65: 4452-9
- Rendon-Mitchell, B., Ochani, M., Li, J., Han, J., Wang, H., Yang, H., Susarla, S., Czura, C., Mitchell, R. A., Chen, G., Sama, A. E. und Tracey, K. J. IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 170: 3890-7
- Ries, S., Schminke, U., Fassbender, K., Daffertshofer, M., Steinke, W. und Hennerici, M. Cerebrovascular involvement in the acute phase of bacterial meningitis. *J Neurol* 1997; 244: 51-5
- Risau, W., Esser, S. und Engelhardt, B. Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathologie-biologie* 1998; 46: 171-5
- RKI Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut/Stand: August 2013. *Epidemiologisches Bulletin* 2013; 34/2013:

- Rodriguez, A. F., Kaplan, S. L., Hawkins, E. P. und Mason, E. O., Jr. Hematogenous pneumococcal meningitis in the infant rat: description of a model. *J Infect Dis* 1991; 164: 1207-9
- Rose, J. A., Rabenold, J. J., Parast, M. M., Milstone, D. S., Abrahams, V. M. und Riley, J. K. Peptidoglycan induces necrosis and regulates cytokine production in murine trophoblast stem cells. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2011; 66: 209-22
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A. und Masure, H. R. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1997; 25: 819-29
- Rouhiainen, A., Kuja-Panula, J., Wilkman, E., Pakkanen, J., Stenfors, J., Tuominen, R. K., Lepantalo, M., Carpen, O., Parkkinen, J. und Rauvala, H. Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). *Blood* 2004; 104: 1174-82
- Rubin, L. L. und Staddon, J. M. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual review of neuroscience* 1999; 22: 11-28
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M. und Tessier, P. A. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 2003; 170: 3233-42
- Saunders, N. R., Knott, G. W. und Dziegielewska, K. M. Barriers in the immature brain. *Cellular and molecular neurobiology* 2000; 20: 29-40
- Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S. und Bhardwaj, N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 191: 423-34
- Scaffidi, P., Misteli, T. und Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-5
- Scheld, W. M., Dacey, R. G., Winn, H. R., Welsh, J. E., Jane, J. A. und Sande, M. A. Cerebrospinal fluid outflow resistance in rabbits with experimental meningitis. Alterations with penicillin and methylprednisolone. *J Clin Invest* 1980; 66: 243-53
- Schiraldi, M., Raucci, A., Munoz, L. M., Livoti, E., Celona, B., Venereau, E., Apuzzo, T., De Marchis, F., Pedotti, M., Bachi, A., Thelen, M., Varani, L., Mellado, M., Proudfoot, A., Bianchi, M. E. und Uguccioni, M. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med* 2012; 209: 551-63
- Schmidt, H., Heimann, B., Djukic, M., Mazurek, C., Fels, C., Wallesch, C. W. und Nau, R. Neuropsychological sequelae of bacterial and viral meningitis. *Brain* 2006; 129: 333-45
- Schroeder, N. W., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zahringer, U., Gobel, U. B., Weber, J. R. und Schumann, R. R. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-

2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003; 278: 15587-94

Schuchat, A., Robinson, K., Wenger, J. D., Harrison, L. H., Farley, M., Reingold, A. L., Lefkowitz, L. und Perkins, B. A. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* 1997; 337: 970-6

Segal, M. B. The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cellular and molecular neurobiology* 2000; 20: 183-96

Shi, Y., Evans, J. E. und Rock, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425: 516-21

Sikora, A., Liu, J., Brosnan, C., Buell, G., Chessel, I. und Bloom, B. R. Cutting edge: purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism. *J Immunol* 1999; 163: 558-61

Silva, E., Arcaroli, J., He, Q., Svetkauskaite, D., Coldren, C., Nick, J. A., Poch, K., Park, J. S., Banerjee, A. und Abraham, E. HMGB1 and LPS induce distinct patterns of gene expression and activation in neutrophils from patients with sepsis-induced acute lung injury. *Intensive care medicine* 2007; 33: 1829-39

Simberkoff, M. S., Moldover, N. H. und Rahal, J., Jr. Absence of detectable bactericidal and opsonic activities in normal and infected human cerebrospinal fluids. A regional host defense deficiency. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1980; 95: 362-72

Sitia, G., Iannacone, M., Muller, S., Bianchi, M. E. und Guidotti, L. G. Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 100-7

Small, P. M., Tauber, M. G., Hackbarth, C. J. und Sande, M. A. Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect Immun* 1986; 52: 484-7

Smith, H. und Bannister, B. Cerebrospinal-fluid immunoglobulins in meningitis. *Lancet* 1973; 2: 591-3

Stahel, P. F., Nadal, D., Pfister, H. W., Paradisi, P. M. und Barnum, S. R. Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. *Lancet* 1997; 349: 1886-7

Sterka, D., Jr. und Marriott, I. Characterization of nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) protein expression in primary murine microglia. *J Neuroimmunol* 2006; 179: 65-75

Sterka, D., Jr., Rati, D. M. und Marriott, I. Functional expression of NOD2, a novel pattern recognition receptor for bacterial motifs, in primary murine astrocytes. *Glia* 2006; 53: 322-30

Strazielle, N. und Gherzi-Egea, J. F. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 561-74

Stros, M. und Dixon, G. H. A retropseudogene for non-histone chromosomal protein HMG-1. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1172: 231-5

Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. und Flavell, R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012; 481: 278-86

Stucki, A., Cottagnoud, M., Winkelmann, V., Schaffner, T. und Cottagnoud, P. Daptomycin produces an enhanced bactericidal activity compared to ceftriaxone, measured by [³H]choline release in the cerebrospinal fluid, in experimental meningitis due to a penicillin-resistant pneumococcal strain without lysing its cell wall. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007; 51: 2249-52

Su, X., Wang, H., Zhao, J., Pan, H. und Mao, L. Beneficial Effects of Ethyl Pyruvate through Inhibiting High-Mobility Group Box 1 Expression and TLR4/NF-kappaB Pathway after Traumatic Brain Injury in the Rat. *Mediators Inflamm* 2011; 2011: 807142

Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H. und Marunouchi, T. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol* 1993; 151: 2150-8

Swartz, M. N. Bacterial meningitis--a view of the past 90 years. *N Engl J Med* 2004; 351: 1826-8

Tadie, J. M., Bae, H. B., Banerjee, S., Zmijewski, J. W. und Abraham, E. Differential activation of RAGE by HMGB1 modulates neutrophil-associated NADPH oxidase activity and bacterial killing. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 302: C249-56

Tak, P. P. und Firestein, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11

Tang, D., Kang, R., Cao, L., Zhang, G., Yu, Y., Xiao, W., Wang, H. und Xiao, X. A pilot study to detect high mobility group box 1 and heat shock protein 72 in cerebrospinal fluid of pediatric patients with meningitis. *Crit Care Med* 2008; 36: 291-5

Tang, D., Shi, Y., Kang, R., Li, T., Xiao, W., Wang, H. und Xiao, X. Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 741-7

Tauber, M. G. und Moser, B. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1999; 28: 1-11; quiz 12

Tenenbaum, T., Essmann, F., Adam, R., Seibt, A., Janicke, R. U., Novotny, G. E., Galla, H. J. und Schroten, H. Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection in vitro. *Brain Res* 2006; 1100: 1-12

Thigpen, M. C., Whitney, C. G., Messonnier, N. E., Zell, E. R., Lynfield, R., Hadler, J. L., Harrison, L. H., Farley, M. M., Reingold, A., Bennett, N. M., Craig, A. S., Schaffner, W., Thomas, A., Lewis, M. M., Scallan, E. und Schuchat, A. Bacterial Meningitis in the United States, 1998-2007. *New England Journal of Medicine* 2011; 364: 2016-2025

Tong, H. H., Blue, L. E., James, M. A. und DeMaria, T. F. Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* 2000; 68: 921-4

- Tsuchiya, K., Toyama, K., Tsuprun, V., Hamajima, Y., Kim, Y., Ondrey, F. G. und Lin, J. Pneumococcal peptidoglycan-polysaccharides induce the expression of interleukin-8 in airway epithelial cells by way of nuclear factor-kappaB, nuclear factor interleukin-6, or activation protein-1 dependent mechanisms. *Laryngoscope* 2007; 117: 86-91
- Tuomanen, E., Tomasz, A., Hengstler, B. und Zak, O. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1985; 151: 535-40
- Tureen, J. H., Dworkin, R. J., Kennedy, S. L., Sachdeva, M. und Sande, M. A. Loss of cerebrovascular autoregulation in experimental meningitis in rabbits. *J Clin Invest* 1990; 85: 577-81
- Tyler, K. L. Bacterial meningitis: an urgent need for further progress to reduce mortality and morbidity. *Neurology* 2008; 70: 2095-6
- Ulloa, L., Ochani, M., Yang, H., Tanovic, M., Halperin, D., Yang, R., Czura, C. J., Fink, M. P. und Tracey, K. J. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12351-6
- van de Beek, D., de Gans, J., Spanjaard, L., Weisfelt, M., Reitsma, J. B. und Vermeulen, M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004; 351: 1849-59
- van Furth, A. M., Roord, J. J. und van Furth, R. Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect Immun* 1996; 64: 4883-90
- van Zoelen, M. A., Schouten, M., de Vos, A. F., Florquin, S., Meijers, J. C., Nawroth, P. P., Bierhaus, A. und van der Poll, T. The receptor for advanced glycation end products impairs host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 2009a; 182: 4349-56
- van Zoelen, M. A., Yang, H., Florquin, S., Meijers, J. C., Akira, S., Arnold, B., Nawroth, P. P., Bierhaus, A., Tracey, K. J. und van der Poll, T. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. *Shock* 2009b; 31: 280-4
- Viallon, A., Guyomarc'h, P., Guyomarc'h, S., Tardy, B., Robert, F., Marjollet, O., Caricajo, A., Lambert, C., Zeni, F. und Bertrand, J. C. Decrease in serum procalcitonin levels over time during treatment of acute bacterial meningitis. *Critical care (London, England)* 2005; 9: R344-50
- Voganatsi, A., Panyutich, A., Miyasaki, K. T. und Murthy, R. K. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 130-4
- Wang, G. G., Calvo, K. R., Pasillas, M. P., Sykes, D. B., Hacker, H. und Kamps, M. P. Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nat Methods* 2006; 3: 287-93
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J.,

- Andersson, U., Molina, P. E., Abumrad, N. N., Sama, A. und Tracey, K. J. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-51
- Wang, H., Liao, H., Ochani, M., Justiniani, M., Lin, X., Yang, L., Al-Abed, Y., Metz, C., Miller, E. J., Tracey, K. J. und Ulloa, L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 2004; 10: 1216-21
- Weber, J. R. und Tuomanen, E. I. Cellular damage in bacterial meningitis: an interplay of bacterial and host driven toxicity. *J Neuroimmunol* 2007; 184: 45-52
- Weir, H. M., Kraulis, P. J., Hill, C. S., Raine, A. R., Laue, E. D. und Thomas, J. O. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMGB1. *EMBO J* 1993; 12: 1311-9
- Weisfelt, M., van de Beek, D., Spanjaard, L., Reitsma, J. B. und de Gans, J. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol* 2006; 5: 123-9
- Wen, L., Huang, J. K., Johnson, B. H. und Reeck, G. R. A human placental cDNA clone that encodes nonhistone chromosomal protein HMG-1. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 1197-214
- WHO World Health Organization, Geneva, Switzerland. Global health estimates 2014. Summary tables: Deaths by cause, age and sex, 2000-2012. June 2014. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html. 2014
- Willingham, S. B., Allen, I. C., Bergstralh, D. T., Brickey, W. J., Huang, M. T., Taxman, D. J., Duncan, J. A. und Ting, J. P. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2009; 183: 2008-15
- Willingham, S. B., Bergstralh, D. T., O'Connor, W., Morrison, A. C., Taxman, D. J., Duncan, J. A., Barnoy, S., Venkatesan, M. M., Flavell, R. A., Deshmukh, M., Hoffman, H. M. und Ting, J. P. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell host & microbe* 2007; 2: 147-59
- Winkler, F., Koedel, U., Kastenbauer, S. und Pfister, H. W. Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J Infect Dis* 2001; 183: 1749-59
- Witzenrath, M., Pache, F., Lorenz, D., Koppe, U., Gutbier, B., Tabeling, C., Reppe, K., Meixenberger, K., Dorhoi, A., Ma, J., Holmes, A., Trendelenburg, G., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., van der Linden, M., Tschopp, J., Mitchell, T. J., Suttorp, N. und Opitz, B. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 2011; 187: 434-40
- Wizemann, T. M., Heinrichs, J. H., Adamou, J. E., Erwin, A. L., Kunsch, C., Choi, G. H., Barash, S. C., Rosen, C. A., Masure, H. R., Tuomanen, E., Gayle, A., Brewah, Y. A., Walsh, W., Barren, P., Lathigra, R., Hanson, M., Langermann, S., Johnson, S. und Koenig, S. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 2001; 69: 1593-8

- Woehrl, B., Brouwer, M. C., Murr, C., Heckenberg, S. G., Baas, F., Pfister, H. W., Zwinderman, A. H., Morgan, B. P., Barnum, S. R., van der Ende, A., Koedel, U. und van de Beek, D. Complement component 5 contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J Clin Invest* 2011; 121: 3943-53
- Woehrl, B., Klein, M., Rupprecht, T. A., Schmetzer, H., Angele, B., Hacker, H., Hacker, G., Pfister, H. W. und Koedel, U. CXCL16 contributes to neutrophil recruitment to cerebrospinal fluid in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 2010; 202: 1389-96
- Yamoah, K., Brebene, A., Baliram, R., Inagaki, K., Dolios, G., Arabi, A., Majeed, R., Amano, H., Wang, R., Yanagisawa, R. und Abe, E. High-mobility group box proteins modulate tumor necrosis factor-alpha expression in osteoclastogenesis via a novel deoxyribonucleic acid sequence. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) 2008; 22: 1141-53
- Yang, D., Chen, Q., Yang, H., Tracey, K. J., Bustin, M. und Oppenheim, J. J. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 59-66
- Yang, H., Hreggvidsdottir, H. S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., Lu, B., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Al-Abed, Y., Akira, S., Bierhaus, A., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U. und Tracey, K. J. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 11942-7
- Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H. E., Susarla, S. M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., Czura, C. J., Roth, J., Warren, H. S., Fink, M. P., Fenton, M. J., Andersson, U. und Tracey, K. J. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 296-301
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R. und Golenbock, D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999; 163: 1-5
- Yu, M., Wang, H., Ding, A., Golenbock, D. T., Latz, E., Czura, C. J., Fenton, M. J., Tracey, K. J. und Yang, H. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 2006; 26: 174-9
- Yu, Y. M., Kim, J. B., Lee, K. W., Kim, S. Y., Han, P. L. und Lee, J. K. Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window. *Stroke* 2005; 36: 2238-43
- Zhang, J. R., Mostov, K. E., Lamm, M. E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M. und Tuomanen, E. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 2000; 102: 827-37
- Zwijnenburg, P. J., van der Poll, T., Florquin, S., Roord, J. J. und Van Furth, A. M. IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis. *J Immunol* 2003; 170: 4724-30

Literaturverzeichnis

Zwijnenburg, P. J., van der Poll, T., Florquin, S., van Deventer, S. J., Roord, J. J. und van Furth, A. M. Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. J Infect Dis 2001; 183: 1143-6

9 Veröffentlichungen

Inhalte dieser Arbeit wurden bereits in der folgenden Originalarbeit aus Gründen der Aktualität veröffentlicht:

Höhne, C., Wenzel, M., Angele, B., Hammerschmidt, S., Hacker, H., Klein, M., Bierhaus, A., Sperandio, M., Pfister, H. W. und Koedel, U. High mobility group box 1 prolongs inflammation and worsens disease in pneumococcal meningitis. Brain 2013; 136: 1746-59

10 Anhang

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien, sofern sie nicht andernorts erwähnt wurden.

10.1 Verwendete Chemikalien

Die Hersteller bzw. Vertreiber der benötigten Chemikalien sind in der folgenden Auflistung angegeben:

Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien, Hersteller bzw. Vertreiber	
Untersuchungs-Kits	
A-438079	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Accutase®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua dest., Endotoxin-frei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BenchMark™	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ceftriaxon	MIP Pharma GmbH, Blieskastel-Niederwürzbach, Deutschland
4,4'-DDT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DiffQuik	Baxter Diagnostics AG, Duding, Schweiz
DPI	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
(Diphenyleneiodonium)	
DTT	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylpyruvat 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FemtoMax Super	Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, USA
Sensitive	
Chemiluminescent	
Substrat Kit	
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Anhang

Hemacolor®	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Schnellfärbung von Blutausstrichen	
HEPES-Natrium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaiser's Glyceringelatine	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Kaninchenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ketamin	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
LDH Cytotoxicity Assay Kit II	Biovision Research Products, Mountain View, USA
Lidocain (Xylocain 1 %)	AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland
Mayer's Hämotoxylin- Lösung	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
MnTBAP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NaCl	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
NAC (N-Acetyl-L- Cystein)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumlactat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NuPAGE® Novex® Transferpuffer, Novex® NP 0006	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
NuPAGE® Novex® MES SDS Laufpuffer, Novex® NP 0002	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
NuPAGE® Novex® Tris- Bis-Gel Novex® NP 0322	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
ox-ATP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Percoll®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Anhang

PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PBS-Tween	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Rekombinantes Box A Protein	IBL International GmbH, Hamburg, Deutschland
rHMGB1	IBL International GmbH, Hamburg, Deutschland
rCXCL2	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
RPMI 1640	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Strata Clean Resin	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Streptavidin, Meerrettichperoxidase-konjugiert	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypan-Blau Lösung 0.4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Türk'sche Lösung	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Xylazin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
z-YVAD-fmk	Biocat GmbH, Heidelberg, Deutschland

10.2 Zellkulturmedien

Tabelle 3 gibt eine Auflistung der für die Zellkulturmedien verwendeten Materialien und deren Hersteller bzw. Vertreiber.

Tabelle 3: Zellkulturmedien

Zellmedien	Hersteller bzw. Vertreiber
DMEM (<i>Dublecco's modified Eagle medium</i>) #D5796	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMEM (<i>Dublecco's modified Eagle medium</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

#D6429

beta-Estradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FBS (Endotoxin-freies, fetales bovines Serum)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nutridoma SP	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
Optimem	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
rM-CSF #300-25	Peptotech Germany, Hamburg, Deutschland

10.3 Antikörper

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Hersteller bzw. Vertreiber
Biotinyliertes Kaninchen-anti-Ziege IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Biotinyliertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Hühner-anti-HMGB1-IgY, polyklonal #326052233	IBL International GmbH, Hamburg, Deutschland
Kaninchen-anti-Maus-HMGB1-IgG, polyklonal #NB100-2322	Acris antibodies, Herford, Deutschland
Kontroll-Antikörper, normales Ziege-IgG #AB-108-C	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Ziege-anti-Maus-RAGE,	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

polyklonal; # AF1179

Ziege-anti-Kaninchen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

IgG, Peroxidase

konjugiert

10.4 Verbrauchsmaterialien

Eine Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller bzw. Vertreiber
Blutagar BD Columbia	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agar mit 5 % Schafsblut	
BD Falcon Cell Strainers	BD Biosciences, □ □ San Jose, Californien, □ USA
Deckgläser, 24 x 50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Einbettmedium für	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Gefrierschnitte	
Fuchs-Rosenthal-	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön,
Zählkammer	Deutschland
Handschuhe Manufix®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sensitive	
Heparin-Natrium 25000	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
IE	
Histoacryl	B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Gewebekleber	
Isofluran, Forene 100 %	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Kanüle BD	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Microlance™ 3, 22G x	
1¼’’ 0.7 mm x 30 mm	
Mikrochemotaxie-	Neuroprobe, Bethesda, USA
Kammer (48-Loch;	
„Boyden Chemotaxis	
Chamber“)	

Anhang

Mikropipetten 100 µl	Blaubrand ®, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Microtest Primaria, 96-well	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Multiwell Primaria 6-well	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Multipipettenspitzen, Combitip plus 5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mundschutzmaske	Medeco B.V., Oud-Beijerland, Niederlande
Klinion® Protection	
Objektträger, Menzel-Gläser Superfrost® 76 x 26 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Plastikschälchen „ <i>Plastic Tissue Dispomolds</i> “ 24 x 24 x 5 mm	DIAPATH S.p.A., Martinengo, Italien
Petrischale 100 x 15 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Polyethylen-Schlauch (0.8 mm ID, 0.96 mm OD)	SIMS Portex Ltd., Hythe, UK
Polypropylen-Röhrchen, Rundboden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S., 0.5-20 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 1.5 ml, 3810X Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
50ml-Röhrchen, konisch, Polypropylen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
15 ml-Röhrchen, konisch, Polystyrol	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spritze 5 ml BD	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Discardit™ II

Spritze 20 ml BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Discardit™ II

Spritze Omnican® F 30 B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

G x ½ '' (Einmal-

Feindosierungsspritze

mit integrierter Kanüle,

0.01 – 1 ml

Zellkulturflasche Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Primaria, 250 ml

Zellschaber (*Cell-Scraper*) Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Pipette 5 ml, 10 ml Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Sieb 70 µm

Zellstofftupfer Maicell® MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Deutschland

4 x 5 cm

10.5 Labormaterial und Geräte

Verwendetes Labormaterial sowie eingesetzte Geräte werden in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Labormaterial, Geräte

Labormaterial und Geräte	Hersteller bzw. Vertreiber
Autoklav Systec DX-23	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Blot-Modul, X-Cell II™ Blot Module	Novex®, San Diego, USA
Brutschränke	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
ChemiDoc-IT® Imaging System	UVP Inc., Upland, USA
Chemikalien-Waage	Kern KB, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland)
Digitalkamera Kodak EasyShare DX4330	Eastman Kodak Company, New York, USA
Druckwandler Sirecust 403 R	Siemens AG München, Deutschland

Anhang

Elektrophoresis Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz
Feinbohrschleifer Proxxon	Proxxon GmbH, Föhren, Deutschland
Micromot 50	
Heizkissen Beurer HK 20	Beurer GmbH, Ulm, Deutschland
Homogenisator	Ultra-Turrax, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Kühltruhe -20 °C	Liebherr International S.A., Bulle, Schweiz
Kühlschränke	AEG AG Frankfurt am Main, Deutschland
Kryostat Leica CM3050	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Lichtmikroskop Nikon TMS	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Lichtmikroskop Leica LEITZ DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus BX51	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mehrkanalpipette 10-100 µl, Eppendorf Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroplattenleser TriStar LB 941	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Moticam 5000 Videokamera	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
Multipipette plus, Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Perfusor	HT Precidor Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Pipetten 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rüttelmixer	Cenco, Breda, Niederlande
Sicherheitswerkbänke	Hera Safe, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Temperatursonde (GTH 1160 Digitalthermometer)	Greisinger electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland)
Thermobad Haake L	Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Anhang

Thermostat Haake D8	Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tiefkühlschrank -80 °	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Vaporisateurs (Isofluran Vet. Med. Vapor.)	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland
Waage	Kern KB, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland)
Zentrifuge Hermle Z360K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

11 Danksagung

Mein herzlicher Dank dient insbesondere meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister und meinem Mitbetreuer Herrn apl. Prof. Dr. med. Uwe Ködel, in deren neuroinfektiologischem Labor ich die vorliegende Arbeit durchführen konnte und die mir während meiner gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herr Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister, dessen Unterstützung ich mir jederzeit bewusst sein durfte, vermittelte mir im Rahmen der regelmäßig stattfindenden Laborbesprechungen stets das Gefühl, ein wertvolles und ebenso geschätztes Mitglied seiner Arbeitsgruppe darzustellen.

Herr apl. Prof. Dr. med. Uwe Ködel begleitete mich mit seiner langjährigen Erfahrung und seinem großen Wissen nach anfänglich intensiver Einarbeitung in die Methodik auf meinem Weg zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten. Gerade bei tierexperimentellen Untersuchungen vermittelte er mir einen verantwortungsvollen Umgang mit den Tieren und stand mir jederzeit unterstützend zur Seite.

Weiterer Dank gilt Frau Barbara Angele, die mir beim Erlernen der *in vitro*-Experimente mit wertvollen Ratschlägen helfend zur Seite stand und mich in aller Form und mit viel Geduld unterstützte.

Insgesamt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister und Herrn apl. Prof. Dr. med. Uwe Ködel für die freundliche Aufnahme in die Gruppe, die tatkräftige Hilfe und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Außerhalb des Labors erfolgte die Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt von der Universität Greifswald, der freundlicherweise die Bakterien zu Verfügung stellte.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner ganzen Familie, die mir das Studium der Humanmedizin überhaupt erst ermöglicht haben, und die mir während meines Studiums und der Dissertation jegliche Unterstützung gewährten.